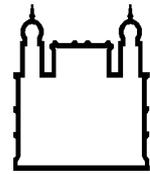




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DE *LACTOCOCCUS LACTIS*
PRODUTOR DE HSP65 NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR
*LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

PRISCILA VALERA GUERRA

Salvador – Bahia

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DE *LACTOCOCCUS LACTIS* PRODUTOR DE HSP65 NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*

PRISCILA VALERA GUERRA

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, para obtenção do grau de Doutor em Patologia.

Salvador – Bahia

2018

Título da Tese: "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DE *LACTOCOCCUS LACTIS* PRODUTOR DE HSP65 NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA PELA *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*."

PRISCILA VALERA GUERRA

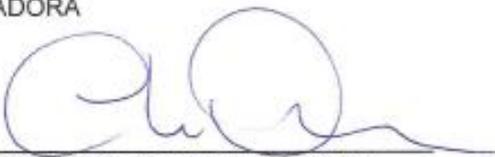
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 21 de junho de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Lêda Quercia Vieira
Professora
UFMG



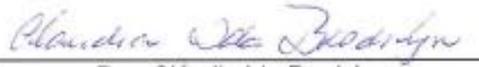
Dra. Camila Alexandrina Viana de
Figueiredo Fontana
Professora
UFBA



Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar
Professora
UFBA



Dr. Ricardo Riccio Oliveira
Pesquisador
IGM/Fiocruz



Dra. Cláudia Ida Brodskyn
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos ao longo do curso.

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia (PGPAT) – FIOCRUZ/UFBA e toda sua equipe.

À minha orientadora Dra. Cláudia Ida Brodskyn, pela oportunidade, confiança e contribuição com a minha formação científica.

À todos os meus amigos de Laboratório, Dra. Juliana Rebouças, Camila Andrade, Marcela Araújo, Ivanéia Valeriano, Rafael Tibúrcio, Sara Nunes, Ícaro Bonyek, Mariana Ampuero e León, que colaboraram não só participando dos experimentos, mas tornando o ambiente de trabalho mais leve e divertido.

À Dra. Ana Caetano e Dra. Tatiani Maiolli da UFMG, por ter nos cedido as cepas utilizadas neste trabalho e disponibilizado seu laboratório para a realização de alguns experimentos. À Juliana Lima, doutoranda do LIB (UFMG), pela ajuda e colaboração em todos os meus experimentos realizados na UFMG.

Ao Dr. Washington, pela colaboração e auxílio na etapa de análises histopatológicas.

À Dra. Jania Teixeira, por todo incentivo e por ter sido a ponte para eu pudesse ingressar na Fiocruz.

Às equipes que compõem as plataformas de citometria e histotecnologia, pelo suporte na aquisição e processamento de amostras.

À equipe da secretaria, por todo o apoio administrativo e por sempre esclarecer minhas dúvidas e trâmites burocráticos.

À equipe da biblioteca pela disponibilidade e auxílio na correção da tese, e elaboração da ficha catalográfica.

À toda minha família, em especial minha mãe Rosângela Guerra, pela educação que me deu, por sempre me ajudar e nunca me deixar desistir.

Aos meus avós Francisco e Dedier Guerra, que também foram responsáveis por boa parte da minha educação, por me apoiarem e acreditarem em mim.

Ao meu tio Ramiro Valera Camacho, que foi quem mais me incentivou a continuar trabalhando na área da pesquisa.

Ao meu namorado Lucas Garcia, pelo apoio que sempre me deu durante todo esse tempo longe da minha família.

GUERRA, Priscila Valera. Avaliação do potencial imunomodulatório de *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 na Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania braziliensis*. 101 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Leishmaniose cutânea e mucosa é uma enfermidade negligenciada causada pela *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*), que cursa com lesões cutâneas decorrentes da inflamação exacerbada induzida pela presença do parasita no tecido cutâneo. Imunologicamente, a inflamação exacerbada é caracterizada pela indução de uma resposta Th1, acompanhada de altos níveis de IFN-gamma e baixos de IL-10. Os *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), são bactérias ácido lácticas Gram positivas e não patogênicas. A forma recombinante de *L. lactis* (*L. lactis*-Hsp65) corresponde à bactérias geneticamente modificadas que produzem e secretam a proteína de choque térmico 65 (Hsp65) derivada da *Mycobacterium leprae*. Nos últimos anos, tem sido demonstrado que a Hsp65 desenvolve um papel importante na modulação imune, controlando, principalmente, respostas autoimunes e inflamatórias. A atividade imunomodulatória da Hsp65 está relacionada com a inibição da produção de TNF- α e IFN- γ , além do incremento na secreção de IL-10 pelas células T. De fato, já foi demonstrado que a administração oral de Hsp65 possui um importante papel na ativação de células T reguladoras presentes na mucosa intestinal. **OBJETIVO:** O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a administração oral de *L. lactis* produtor de Hsp65 como um potencial imunomodulador em um modelo experimental de leishmaniose cutânea. **MATERIAL E MÉTODOS:** Camundongos BALB/c receberam por via oral cepas de *L. lactis* recombinantes, produtores ou não produtores de HSP65, por um período de 4 dias consecutivos. Dez dias após a administração das bactérias, os animais foram infectados com *L. braziliensis* (Lb) na derme orelha esquerda. Dois dias antes da infecção, dois grupos receberam uma administração intraperitoneal de PAM3CSK4 (PAM, agonista de TLR2), um que recebeu a cepa recombinante *L. lactis*-HSP65 e o outro não. **RESULTADOS:** A avaliação semanal da espessura da lesão na orelha mostrou que durante a infecção, os animais que receberam a *L. lactis* produtor de HSP65, associado ou não ao PAM, apresentaram lesões menores e com resposta inflamatória menos intensa comparados aos animais dos grupos controles (Lb, Vazio e PAM). Além disso, a carga parasitária, tanto na orelha quanto no linfonodo drenante, foi reduzida ao final do experimento nos animais administrados com *L. lactis* produtor de Hsp65. Também foi observada uma redução significativa na destruição tecidual, assim como elevada produção de IL-10 e baixa de IFN- γ nos linfonodos drenantes principalmente pelos animais que receberam a cepa *L. lactis* produtor de Hsp65, associada ao PAM. A administração da HSP65 também induziu o aumento de células expressando CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺LAP⁺ (TGF- β associado à membrana) nos linfonodos drenantes e mesentéricos após a infecção. **CONCLUSÕES:** Nossos resultados sugerem que a administração de *L. lactis* produtor de Hsp65 leva à modulação da resposta inflamatória, com redução da inflamação e aumento da tolerância oral. Assim, *L. lactis* produtor de Hsp65 pode

ser visto como um candidato na profilaxia, não somente de doenças autoimunes, mas também de doenças inflamatórias como a leishmaniose cutânea.

Palavras chave: Hsp65, Leishmaniose, *Leishmania braziliensis*, *Lactococcus lactis*, Tolerância oral.

GUERRA, Priscila Valera. Avaliação do potencial imunomodulatório de *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 na Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania braziliensis*. 101 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cutaneous and mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*, is characterized by the induction of a Th1 response that results in a strong inflammatory reaction. The exacerbated inflammation observed in CL lesions might be controlled by anti-inflammatory responses. *Lactococcus lactis*, are nonpathogenic and Gram positive lactic acid bacteria and *Lactococcus lactis* HSP65 are genetically modified bacteria that produces the 65kDa heat shock protein (HSP65), which elicit immunomodulatory activity by inhibiting TNF- α and IFN- γ production and increase IL-10 secretion by T cells. Hsp65 also has a strong effect on induction of regulatory T cells in the gut, when ingested by oral administration. It has been demonstrated that Hsp65 play a major role in immune modulation, controlling, for instance, inflammatory and autoimmune responses. **OBJECTIVE:** In this study, our main objective is to test oral administration of *Lactococcus lactis* producing Hsp65, as a potential immunomodulatory in experimental model of cutaneous leishmaniasis. **MATERIAL AND METHODS:** BALB/c mice received by oral route recombinant *Lactococcus lactis* strains which produces or not Hsp65 for 4 consecutive days. Ten days after administration, animals were infected in the left ear with *Leishmania braziliensis*. Two days before infection, one of the groups that received recombinant *L. lactis* also was injected by intraperitoneal via with PAM3CSK4 (TLR2 agonist). **RESULTS:** Evaluation of ear thickness showed that during infection, mice treated with *L. lactis* Hsp65 associated or not with Pam showed smaller lesions with a less intense inflammatory response compared to control groups (Lb, “Empty” and PAM). In addition, parasite load was lower at the end of the experiment in Hsp65 treated groups, both in ear and draining lymph nodes. A tissue destruction reduction was observed, as well as higher IL-10 and lower IFN- γ production by draining lymph nodes mainly by the Hsp65 treated animals, associated with PAM. HSP65 administration also induced increase of regulatory cells expressing CD4⁺LAP⁺ (membrane associated-TGF- β) and CD4⁺Foxp3⁺ in draining and mesenteric lymph nodes after infection. **CONCLUSION:** Our data suggest that administration of *L. lactis* Hsp65 producer may lead to an inflammatory response modulation, with inflammation reduction and oral tolerance increased. In addition, *L. lactis* Hsp65 producer can be seen as a candidate for prophylaxis, not only for autoimmune, but also for inflammatory diseases such as cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Hsp65, Leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, *Lactococcus lactis*, Oral tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Status de endemicidade da Leishmaniose cutânea no mundo, 2015	14
Figura 2	Ciclo de vida de <i>Leishmania ssp</i>	17
Figura 3	Células dendríticas e macrófagos na infecção por <i>Leishmania</i>	21
Figura 4	Mecanismos de indução de tolerância oral	26
Figura 5	Mecanismos de tolerância oral por baixa e alta dose	27
Figura 6	Desenho Experimental do Estudo	36
Figura 7	Representação dos vetores de expressão pXyIT:SEC:Hsp65	39
Figura 8	<i>Dot plots</i> das estratégias de <i>gating</i> para a análise das citocinas intracelulares por citometria de fluxo	44
Figura 9	Desenvolvimento das lesões em camundongos BALB/c administrados com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 e infectados com <i>L. braziliensis</i>	45
Figura 10	Cinética das lesões em camundongos BALB/c administrados com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 e infectados com <i>L. braziliensis</i>	47
Figura 11	Avaliação da carga parasitária no sítio de inoculação e no linfonodo de drenagem da lesão em camundongos BALB/c após infecção por <i>L. braziliensis</i>	49
Figura 12	Produção de citocinas inflamatórias por células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c	51
Figura 13	Produção de citocinas reguladoras por células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c	52
Figura 14	Perfil de citocinas produzidas por células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c re-estimuladas com <i>L. braziliensis</i>	53
Figura 15	Razão entre a produção de IFN- γ e IL-10 por células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c re-estimuladas com <i>L. braziliensis</i>	54
Figura 16	Expressão de IFN- γ e IL-10 intracelular em cultura de células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c após infecção	56
Figura 17	Expressão de LAP e Foxp3 em cultura de células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c após infecção	57

Figura 18	Expressão de LAP e Foxp3 em cultura de células de linfonodo mesentérico de camundongos BALB/c após infecção	59
Figura 19	Produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos BALB/c após infecção	60
Figura 20	Produção de citocinas reguladoras por esplenócitos de camundongos BALB/c após infecção	61
Figura 21	Análise histológica da lesão de camundongos BALB/c após infecção	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais espécies causadoras de LTA no Brasil e suas manifestações clínicas	19
Tabela 2	Principais parâmetros imunológicos modulados pela tolerância Oral	25
Tabela 3	Linhagens bacterianas utilizadas no estudo	38
Tabela 4	Protocolo de avaliação da histopatologia da orelha de camundongos BALB/c após infecção por <i>L. braziliensis</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL2	Proteína 1 quimiotática de monócitos
CD	Célula dendrítica
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
HSP	Heat shock protein
IFN- γ	Interferon gama
IL-	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
LAP	Latency associated peptide
Lb	<i>Leishmania braziliensis</i>
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmaniose tegumentar
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
MS	Ministério da Saúde
NK	Natural <i>killer</i>
NO	Óxido nítrico
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde/World Health Organization
PAM	Synthetic triacylated lipopeptide
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE	Prostaglandina E
PKC	Proteína cinase C
PMN	Células Polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
SBF	Soro bovino fetal
TGF- β	Fator de transformação do crescimento
Th	<i>T helper</i>
TLR	Toll-like receptors
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral do tipo alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	EPIDEMIOLOGIA	14
1.2	AGENTE ETIOLÓGICO, VETOR E CICLO BIOLÓGICO	15
1.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	17
1.4	RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO POR LEISHMANIA EM MODELOS EXPERIMENTAIS	19
1.5	TOLERÂNCIA ORAL	25
1.6	BACTÉRIAS LÁCTICAS E <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i>	29
1.7	PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPS)	31
2	JUSTIFICATIVA	33
3	HIPÓTESE	34
4	OBJETIVOS	35
4.1	GERAL	35
4.2	ESPECÍFICOS	35
5	DESENHO EXPERIMENTAL	36
6	MATERIAIS E MÉTODOS	37
6.1	ANIMAIS	37
6.2	LINHAGENS BACTERIANAS E ACONDICIONAMENTO BIOLÓGICO	37
6.3	INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>L. LACTIS</i>	39
6.4	ADMINISTRAÇÃO E GRUPOS EXPERIMENTAIS	40
6.5	PARASITAS	40
6.6	INFECÇÃO EXPERIMENTAL	41
6.7	DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA	41
6.8	PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE CÉLULAS	41
6.9	DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA	42
6.10	DETECÇÃO DE CITOCINAS INTRACELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	43
6.11	ANÁLISE DA CITOMETRIA DE FLUXO	43
6.12	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA LESÃO	44
6.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44

7	RESULTADOS	45
7.1	LESÕES DE CAMUNDONGOS BALB/C ADMINISTRADOS COM <i>L. LACTIS</i> PRODUTOR DE HSP65 APÓS INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	45
7.2	CINÉTICA DAS LESÕES DE CAMUNDONGOS BALB/C ADMINISTRADOS COM <i>L. LACTIS</i> PRODUTOR DE HSP65 APÓS INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	46
7.3	AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA NO SÍTIO DE INOCULAÇÃO E NO LINFONODO DE DRENAGEM DA LESÃO EM CAMUNDONGOS BALB/C APÓS INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	48
7.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS IFN- γ , IL-10, IL-17 E TGF- β PELAS CÉLULAS DE LINFONODO DRENANTE DE CAMUNDONGOS BALB/C APÓS INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	50
7.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DIFERENTES MARCADORES CELULARES EM CULTURA DE CÉLULAS DE LINFONODO DRENANTE DE CAMUNDONGOS BALB/C APÓS INFECÇÃO	55
7.6	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DIFERENTES MARCADORES CELULARES EM CULTURA DE CÉLULAS DE LINFONODO MESENTÉRICO DE CAMUNDONGOS BALB/C APÓS INFECÇÃO	58
7.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS IFN- γ , IL-10 E TGF- β PELOS ESPLÊNOCITOS DE CAMUNDONGOS BALB/C APÓS INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	60
7.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES	62
8	DISCUSSÃO	66
9	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as leishmanioses correspondem à segunda doença de maior importância no mundo causada por protozoários, estando entre as 11 doenças infecto-parasitárias mais prevalentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). As leishmanioses ocorrem em 4 continentes, sendo consideradas endêmicas em 98 países, destes, 42 para Leishmaniose Cutânea (**Fig. 1**). Atualmente, mais de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, incluindo 72 países em desenvolvimento. Apesar das medidas adotadas pelos programas de controle, a incidência da doença vem aumentando nos últimos anos em várias regiões do mundo, com aproximadamente 12 milhões de casos de leishmaniose. Em relação à leishmaniose tegumentar (LT), ocorrem cerca de 1,5 milhões de novos casos por ano e, destes, apenas 600.000 são oficialmente notificados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

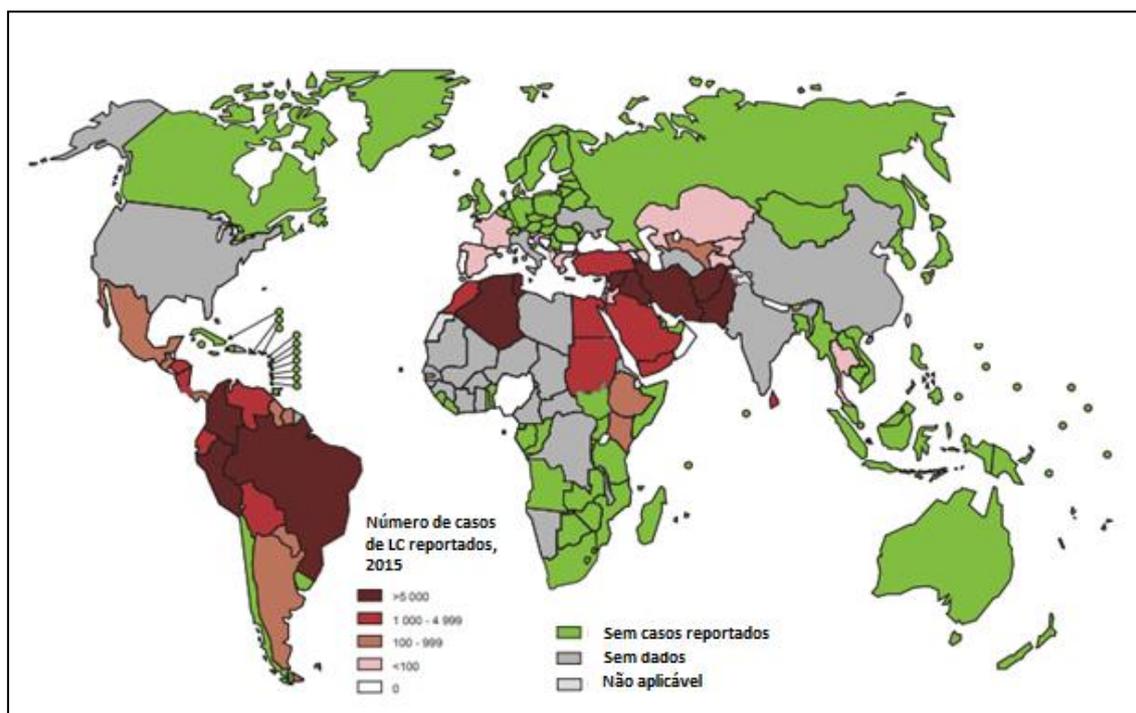


Figura 1 – Status de endemicidade da Leishmaniose cutânea no mundo, 2015 (WHO, 2017)

A LT tem uma ampla distribuição no mundo, e no continente americano existem registros do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. No Brasil, a LT ocorre em

praticamente todo o território nacional, estando em plena expansão. Foram registrados 237.145 casos no período entre 2005 e 2015 distribuídos em todas as Unidades Federativas, predominando atualmente na região Norte (42%) e região Nordeste (31%). Em média são registrados 21.000 casos/ano, com coeficiente de incidência de 17,0 casos/100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Na Bahia, a LT encontra-se dispersa em todo o Estado, presente em 55.4% dos municípios no ano de 2014. Entre os anos de 2012 e 2014, as regiões de maior incidência foram Taperoá, Wenceslau Guimarães, Teolândia e Nilo Peçanha com 1.881, 976, 963 e 814 casos, respectivamente. No Estado da Bahia, a média anual de casos nesse mesmo período foi de aproximadamente 3.282 casos. Nos últimos anos, foram detectados casos de LT em importantes centros urbanos da Bahia, como: Santo Antônio de Jesus, Lauro de Freitas, Jequié, Vitória da Conquista e até mesmo Salvador, demonstrando assim que a doença está ampliando seu potencial de urbanização (SUVISA, 2015).

No Brasil, a LT ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, entretanto, há predominância na faixa de 10 a 59 anos, representando 90% dos casos, e no sexo masculino, com aproximadamente 74%. Além da elevada incidência, a doença assume, nas suas formas mucocutânea e cutânea difusa, importante papel econômico e social, por acarretar lesões desfigurantes e, muitas vezes, incapacitantes, podendo ser enquadrada como uma doença ocupacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO, VETOR E CICLO BIOLÓGICO

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que tem seu ciclo biológico realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado. O parasito ocorre sob duas formas evolutivas: promastigota, a forma flagelada, extracelular, localizada no trato digestivo de seus vetores, os flebotomíneos; e amastigota, localizada parasitando células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros mamíferos (ALEXANDER *et al.*, 1999).

Foram identificadas 07 espécies de *Leishmania* envolvidas na etiopatogenia da doença tegumentar no Brasil, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*. Outras espécies do subgênero *Viannia* foram identificadas nas regiões Norte e Nordeste: *L.(V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenberg*. No estado da Bahia, a LT é causada principalmente pela *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, sendo portanto, os principais agentes etiológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A transmissão da doença ocorre através da picada de insetos fêmeas de flebotomíneos, pertencentes à ordem Díptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, que pertencem a diferentes gêneros: *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo (LAISON; SHAW, 1987). Somente as fêmeas são hematófagas e consideradas transmissoras. No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LT são *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. umbratilis*, *Lu. wellcomei*, *Lu. flaviscutellata* e *Lu. migonei* (LAISON; RANGEL, 2005).

O ciclo de vida da *Leishmania* é iniciado no intestino médio do flebótomo, quando as promastigotas procíclicas de *Leishmania* se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectantes. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo infectado regurgita as promastigotas metacíclicas juntamente com uma variedade de componentes salivares imunomodulatórios, importantes para o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado. As leishmanias são então fagocitadas por uma variedade de tipos celulares presentes no ambiente local, como neutrófilos e macrófagos (revisto em KAYE; SCOTT, 2011). Como os neutrófilos têm vida útil muito curta, os macrófagos são as células hospedeiras finais para a proliferação dos parasitos (ANTONIE *et al.*, 1998). Após a internalização nos fagolisossomos dos macrófagos, as metacíclicas se transformam em amastigotas. As amastigotas sofrem replicação nas células do hospedeiro, que se rompem quando há uma grande quantidade de amastigotas no seu interior, permitindo a reinfecção de outros fagócitos locais. O ciclo de transmissão é completo quando os fagócitos infectados são ingeridos por outro flebotomíneo durante um novo repasto sanguíneo. As amastigotas são submetidas a uma série de alterações morfológicas no flebotomíneo, onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectantes (KAYE; SCOTT, 2011) (**Figura 2**).

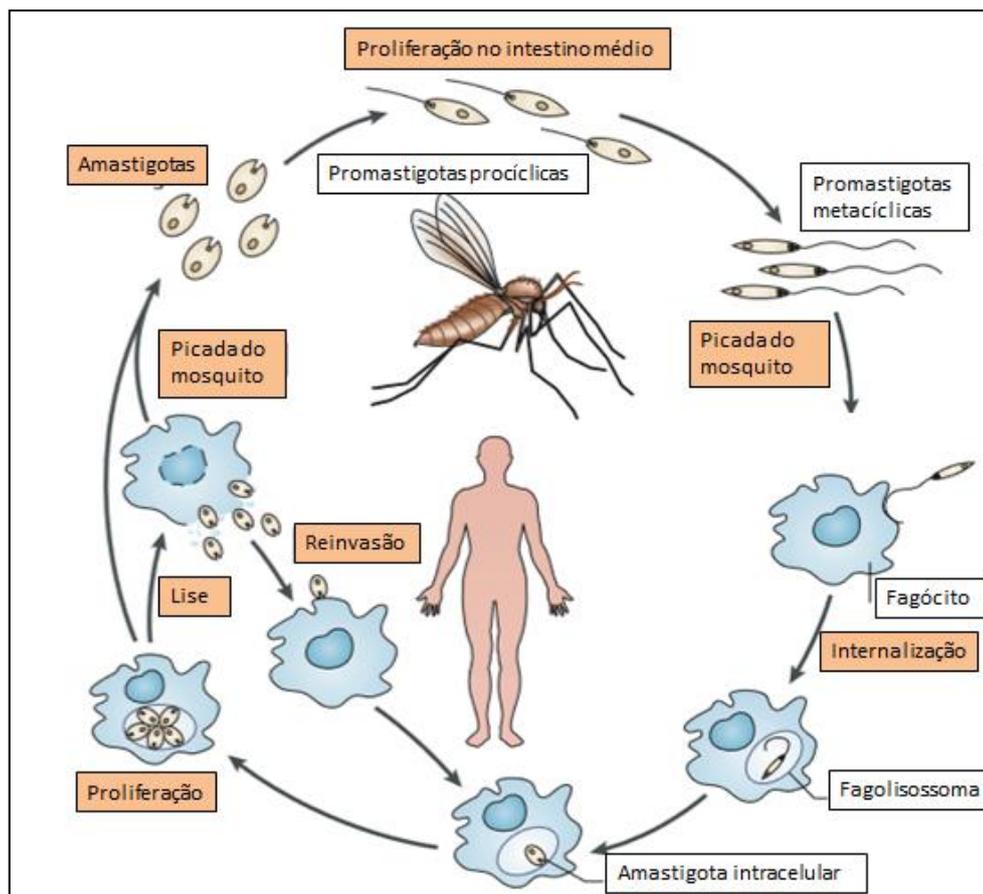


Figura 2 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Fonte: Adaptado de Paul Kaye & Phillip Scott, 2011).

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O curso da infecção em vertebrados é altamente variável, sendo dependente da espécie de *Leishmania*, da resposta imunológica e de características genéticas do hospedeiro, o que origina variados quadros clínicos.

Clinicamente, a LT apresenta-se de maneira variada, desde ulcerações na pele, que podem ser discretas ou extensas e com evolução espontânea para cura após alguns meses, até aquelas com ulcerações múltiplas ou disseminadas, ou aquelas que podem evoluir para uma forma mutilante, que afeta as mucosas das vias aéreas superiores. Nas Américas, a doença é denominada de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e manifesta-se sob as formas de leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose cutânea disseminada (LD) (PEARSON e SOUSA, 1996), listadas na **Tabela 1**.

A LCL é a forma mais frequente da doença e caracterizada por lesões ulceradas, de bordas elevadas e circulares, com pouca secreção e indolores, que na maioria das vezes

apresenta tendência à cura espontânea e boa resposta ao tratamento. Ao evoluir para a cura, as lesões costumam deixar cicatrizes atróficas, com superfície lisa e áreas de hipo ou hiperpigmentação. O principal agente etiológico causador da LCL no Brasil é a *L. braziliensis*. (MARSDEN *et al.*, 1984; COSTA *et al.*, 1990; HERWALDT *et al.*, 1992; CONVIT *et al.*, 1993).

A LMC tem como agente etiológico a *L. braziliensis* e apresenta significativa morbidade, podendo levar a um curso fatal. Tem início com uma simples ulceração na pele que pode desaparecer, e após alguns anos o indivíduo pode desenvolver lesões destrutivas da mucosa, tanto da nasofaringe quanto da orofaringe. Em 1 a 5% dos pacientes, a leishmaniose mucocutânea pode se desenvolver devido à capacidade do parasita de persistir na lesão após a cura e metastatizar para a mucosa nasal. Essas lesões apresentam um número bastante reduzido de parasitos com uma intensa resposta inflamatória, responsável pela destruição tecidual (MARSDEN, 1986; CARVALHO *et al.*, 1995). Nesta forma clínica, há uma exacerbação na produção de Interferon-gama (IFN- γ), significativamente maior do que o observado na LCL, associado à baixa produção de Interleucina 10 (IL-10), o que impede a modulação da resposta (BITTENCOURT; BARRAL, 1991; PEARSON *et al.*, 2000; MARSDEN, 1986).

A LD é caracterizada por úlceras típicas associadas a inúmeras lesões papulares ou de aparência acneiforme, resultantes de uma disseminação hematogênica, envolvendo, com frequência, a face e o tronco (COSTA *et al.*, 1986; CARVALHO, 1994). As duas espécies reconhecidas como causadoras desta forma de leishmaniose são *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (VIEIRA *et al.*, 2002; PEARSON e SOUSA, 1996).

Tabela 1. Principais espécies causadoras de LTA no Brasil e suas manifestações clínicas

Formas Clínicas	Espécies causadoras	Manifestações Clínicas	Principais citocinas envolvidas na patologia
LCL	<i>L. braziliensis</i>	Lesões únicas ou limitadas, ulceradas e de bordas elevadas; Moderada carga parasitária presente nas lesões	IFN- γ +++, IL-10 ++
LMC	<i>L. braziliensis</i>	Lesões altamente inflamatórias envolvendo membranas mucosas; Raros parasitas encontrados nas lesões	IFN- γ +++++, IL-10 +
LCD	<i>L. amazonensis</i>	Lesões múltiplas, não-ulceradas, disseminadas; muitos parasitas presentes nas lesões	IFN- γ \pm , IL-10 +++++
LD	<i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i>	Numerosas lesões papulares em diferentes áreas do corpo; poucos parasitas presentes nas lesões	IFN- γ +, IL-10 ++

-, Ausência; +, Presença; + Baixo, ++, Moderado; +++ Alto; +++++ Muito alto. (Adaptado de DE LUCA & MACEDO, 2016; SCORZA *et al.*, 2017)

1.4 RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* EM MODELOS EXPERIMENTAIS

A resposta imunológica do hospedeiro inicia-se quando o flebotômíneo introduz sua probóscide na derme do hospedeiro vertebrado, atingindo os vasos dérmicos superficiais e dando origem a um lago sanguíneo. A saliva do flebotômíneo contém substâncias que facilitam a inoculação do parasito e sua veiculação à corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, como vasodilatadores e antiagregantes plaquetários (HASKO *et al.*, 2000).

Quando os parasitos são lançados no hospedeiro vertebrado, vários tipos celulares, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas são recrutados para o sítio de infecção, e sua interação com os parasitos determina o desfecho da infecção. A fagocitose dos parasitos pelos macrófagos induz a liberação de fatores quimiotáticos, como CCL2 e CXCL1, capaz de recrutar monócitos e neutrófilos (RACOOSIN; BEVERLEY, 1997). Vários estudos tem demonstrado que os neutrófilos podem influenciar a infecção por *Leishmania*, fagocitando o parasita e levando-o à morte intracelular, ou agindo pela morte extracelular através da liberação de uma rede de fibras que se ligam aos patógenos, também chamada de NET (*Neutrophil Extracellular Trap*), constituídas por cromatina e proteínas granulares (JOHN;

HUNTER, 2008; GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009; MOUGNEAU *et al.*, 2011). Os neutrófilos são caracterizados por serem fagócitos de vida curta, desse modo tem sido proposto que eles atuem como “cavalos de troia” usados pelos parasitas, como uma maneira silenciosa de entrar nos macrófagos evitando sua ativação. As promastigotas inibem os sinais apoptóticos celulares dos neutrófilos, aumentando sua vida útil, permitindo a disseminação do parasita e se tornam incapazes de matar a *Leishmania* (AGA *et al.*, 2002; LAUFS *et al.*, 2002; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Embora os neutrófilos sejam as células mais encontradas no sítio de infecção durante as primeiras horas, eles secretam elevados níveis de CCL4 capaz de recrutar uma grande quantidade de macrófagos para o local. Uma vez recrutados, os macrófagos fagocitam células polimorfonucleares (PMNs) infectadas, bem como parasitas livres, e se tornam a célula hospedeira definitiva, tanto para replicação como destruição do parasita (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; LIU; UZONNA, 2012).

Após a internalização pelos macrófagos, há a formação dos fagolisossomos, onde as formas promastigotas metacíclicas rapidamente transformam-se em amastigotas, formas estas mais resistentes à destruição pelo sistema imunológico do hospedeiro, adaptando-se ao pH ácido do meio (ZAMBRANO-VILLA *et al.*, 2002).

Os macrófagos são, portanto, as principais células efetoras responsáveis pela destruição dos parasitos, e sua ativação é determinante para a eliminação do patógeno intracelular. Esse processo pode ser dividido funcionalmente em duas vias distintas: ativação clássica e alternativa. A ativação clássica é mediada pelos produtos das células Th1, como IFN- γ e Fator de necrose tumoral (TNF), que agem estimulando os macrófagos a produzir óxido nítrico sintase induzida (iNOS), uma enzima que catalisa L-arginina para gerar óxido nítrico (NO), sendo que uma de suas funções é a destruição de parasitos como a *Leishmania* (LIEW *et al.*, 1990; BRONTE; ZANOVELLO, 2005). Ocorre também a produção de radicais livres de oxigênio (ROS) pela ação da NADPh oxidase (LIU; UZONNA, 2012). A ativação alternativa de macrófagos é mediada por citocinas Th2, como IL-4 e IL-13, as quais induzem a atividade da arginase e produção de poliaminas que favorecem o crescimento do parasita. A infecção por *Leishmania* também pode levar a produção de citocinas imunorreguladoras, como IL-10 e TGF- β que agem desativando e inibindo os macrófagos de produzirem citocinas inflamatórias (GORDON, 2003; LIU; UZONNA, 2012; VON DER WEID *et al.*, 1996; KANE; MOSSER, 2001) (**Figura 3**).

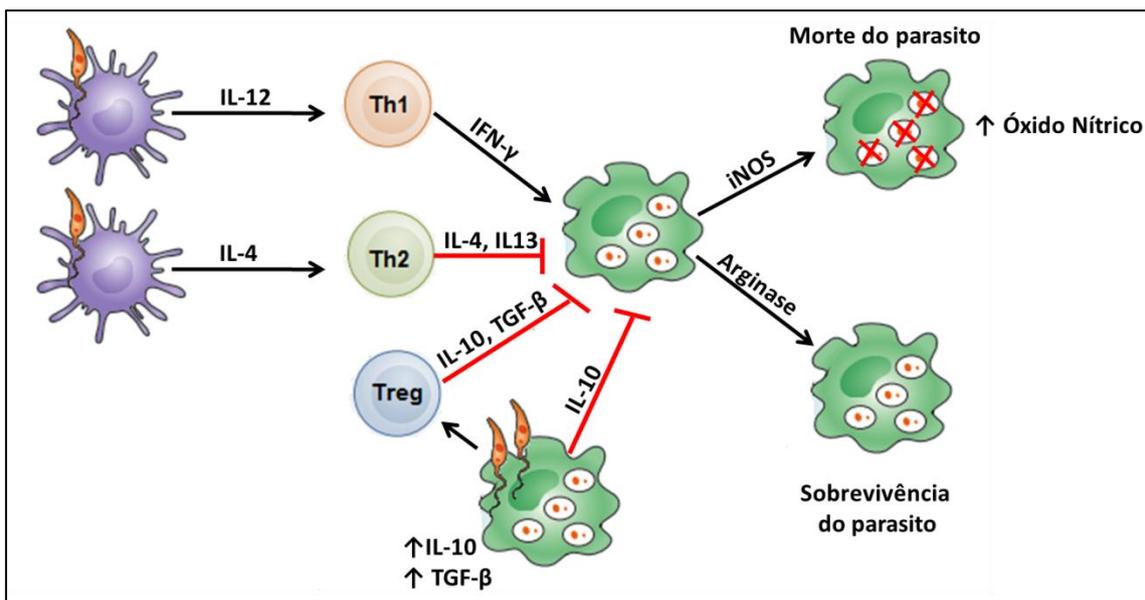


Figura 3. Células dendríticas e macrófagos na infecção por *Leishmania*. (Fonte: Adaptado de LIU & UZONNA, 2012).

Os modelos experimentais de leishmaniose tegumentar têm trazido uma grande contribuição para o esclarecimento da imunorregulação da doença. A diferenciação em resposta Th1 ou Th2, respectivamente associada com resistência/cura ou susceptibilidade/cronicidade à infecção, parece ser multifatorial, sendo um desses fatores a própria espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e a linhagem utilizada (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

Já está bem estabelecido que a maioria das linhagens de camundongo (C3H/HeJ, CBA, C57BL/6 e 129Sv/Ev) são resistentes à infecção por *L. major* e desenvolvem lesões locais que cicatrizam espontaneamente por volta de 10 a 12 semanas (MODABBER, 1989). Camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* desenvolvem lesões cutâneas localizadas que resolvem espontaneamente. A cura é dependente do desenvolvimento de uma resposta imunológica do tipo Th1, com produção de IL-12 e IFN- γ , que ativam as células infectadas, que por sua vez produzem NO para eliminar os parasitos. No sítio de infecção, ainda encontram-se poucos parasitas viáveis devido a presença de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ produtoras de IL-10 (BELKAID; RICCIRILLO; MENDEZ, 2002 ; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Qualquer falha na montagem de uma resposta eficiente Th1 anti-*Leishmania* resultaria em doença progressiva e morte. Ao contrário, nos camundongos BALB/c susceptíveis à *L. major*, há o desenvolvimento de lesões severas e não controladas, com o predomínio de uma resposta imunológica do tipo Th2, determinada pela presença de IL-4, que leva à progressão da doença (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Tem sido

demonstrado que a susceptibilidade nesse modelo está associada à ausência de IL-12. Desse modo, não há o desenvolvimento de células Th1 resultando em lesões cutâneas progressivas e infecção visceral disseminada (GÜLLER *et al.*, 1996; BELKAID, 2003).

A resposta imunológica específica da leishmaniose é basicamente mediada por células T CD4⁺, que vão liberar citocinas após a apresentação de antígenos pelas células dendríticas, nos linfonodos regionais. Vários estudos vêm mostrando que as citocinas possuem papel relevante na resistência e susceptibilidade à infecção. Na infecção por *L. major*, camundongos C57BL/6 deficientes em TNF- α apresentaram infecção visceral mesmo com a produção de IFN- γ e IL-12 pelos macrófagos (WILHELM *et al.*, 2001). Já em camundongos BALB/c tratados com TNF- α , foi observada uma redução no tamanho e na carga parasitária das lesões cutâneas (THEODOS *et al.*, 1991).

Ao contrário do que ocorre com *L. major*, poucos estudos experimentais foram conduzidos com *L. braziliensis*, provavelmente porque este parasito não induz lesões em muitas linhagens de camundongos (NEAL; HALE, 1983; CHILDS *et al.*, 1984). A maioria das linhagens de camundongos é resistente à infecção por *L. braziliensis* devido a incapacidade dessa espécie de suprimir uma reposta imune Th1 (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998). Já foi demonstrado que linhagens murinas de C3H/HeJ, C57BL/6J E CBA/CaJ não mostraram nenhum indício de infecção por *L. braziliensis* (CHILDS *et al.*, 1984).

Até o momento, o modelo animal que mais mimetiza a infecção humana por *L. braziliensis* é o hamster sírio (*Mesocricetus auratus*). Entretanto, os estudos *in vivo* com esses animais são limitados pela dificuldade de se encontrar reagentes e insumos para a realização de experimentos. Um estudo mostrou que, após a infecção por *L. braziliensis*, todos os hamsters desenvolveram lesões cutâneas bem semelhantes às observadas em humanos (GOMES-SILVA *et al.*, 2013).

Entre os camundongos, a linhagem mais susceptível à infecção por *L. braziliensis* é o BALB/c, que apresenta desfecho clínico similar ao observado no humano, principalmente em relação à persistência do parasita, resposta imune e ulceração da lesão. Entretanto, o BALB/c não apresenta lesões cutâneas graves e evoluem para a cura espontânea (CHILDS *et al.*, 1984). É interessante notar, que além da resposta imune adaptativa, inúmeros trabalhos tem demonstrado a importância das respostas mediadas por receptores de reconhecimento de padrões (PRR) como os TLRs (Toll like receptors). Assim já foi demonstrado que LPG é um fator de virulência para algumas espécies de *Leishmania* (*L. major* e *L. donovani*) (SPÄTH *et al.*, 2000), mas também pode atuar como um ligante para a sinalização mediada por TLR2 e TLR4, importantes na indução de respostas do tipo Th1 (BECKER *et al.*, 2003).

Em um estudo *in vitro* foi demonstrado que células dendríticas de camundongos C57BL/6 quando co-cultivadas na presença de Pam3CSK4 (agonista de TLR2) e *L. braziliensis* produziam quantidades maiores de IL-12p40 e menores de IL-10 (VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2009). Já a co-infecção de camundongos BALB/c utilizando *L. major* e Pam3CSK4 desencadeou uma forte resposta pró-inflamatória nos locais de infecção, comprovando seu papel de ativador inflamatório (HUANG *et al.*, 2015). Sabe-se que o Pam3CSK4 promove uma forte resposta imune inata e adaptativa, e é considerado uma nova classe promissora de adjuvante (DUTHIE *et al.*, 2011).

Neste estudo, utilizamos o ligante de TLR2 (Pam3CSK4) em alguns grupos com o objetivo de induzir uma resposta inflamatória mais rápida e intensa do que aquela induzida pela infecção por *L. braziliensis*, que seria responsável por disparar o efeito anti-inflamatório induzido pela ingestão de Hsp65.

O primeiro trabalho a analisar a resposta imunológica no modelo experimental em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* mostrou que estes animais produziam menos IL-4 em comparação com os animais infectados com *L. major*. Além disso, os animais infectados com *L. braziliensis*, quando tratados com anti-IFN- γ , apresentavam lesões significativamente aumentadas, sem resolução da infecção (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998). Desta forma, um mecanismo dependente de IFN- γ parece ser responsável pela morte de *L. braziliensis* em camundongos BALB/c. A baixa infectividade deste parasito nesta linhagem de camundongo poderia ser causada pela incapacidade do parasito em promover uma produção forte e sustentada de IL-4, diferentemente do que acontece com a infecção por *L. major* (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998).

Em camundongos BALB/c, a infecção por *L. braziliensis* na pata também leva ao desenvolvimento de lesões pequenas, não ulceradas e que evoluem para a auto-cura. Entretanto, quando a infecção é realizada na derme da orelha, há a formação de pequenas lesões ulceradas que posteriormente cicatrizam (INDIANI DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; DE MOURA *et al.*, 2005).

No trabalho de De Moura e colaboradores (2005), a infecção por *L. braziliensis* foi capaz de reproduzir vários aspectos da infecção natural, tais como, a presença de lesão ulcerada, disseminação do parasito para os linfonodos e desenvolvimento de uma forte resposta imunológica tipo Th1, com produção de IFN- γ e IL-17, e expressão de algumas quimiocinas pró-inflamatórias (DE MOURA *et al.*, 2005). Neste mesmo modelo, observou-se também uma resposta imunológica Th1/Th2, caracterizada pela presença de células secretando IFN- γ , IL-4 e a citocina imunorreguladora IL-10, que é diferente da resposta

polarizada Th2 observada nas infecções por *L. major*. Além disso, os parasitos foram eliminados do sítio de infecção após a cura da lesão, mas persistiram nos linfonodos de drenagem, sugerindo que mecanismos imunorregulatórios possam permitir a sobrevivência do parasito (COSTA *et al.*, 2011; FALCÃO *et al.*, 2012; DE MOURA *et al.*, 2005). Foi demonstrado previamente que camundongos C57BL/6 exibem um fenótipo de resistência quando infectados por *L. braziliensis*, com uma produção significativamente baixa de IL-4 e IL-13, ao mesmo tempo em que IFN- γ e iNOS são produzidos de maneira significativa (DEKREY *et al.*, 1998).

Outros trabalhos com cepas de *L. braziliensis* de alta e baixa virulência mostraram que camundongos BALB/c infectados com cepas menos patogênicas controlam mais cedo a infecção, e esse controle estaria associado à presença de células *Natural Killer* (NK) no sítio da lesão, além do aumento na produção de IFN- γ e da quimiocina CXCL10 logo nas primeiras horas após infecção (INDIANI DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Entretanto, nas infecções causadas por cepas mais patogênicas de *L. braziliensis*, a cura mais tardia coincide com a produção de IFN- γ e com a expressão de CXCL10, sugerindo que essa quimiocina poderia ter um papel importante no controle da doença (INDIANI DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Em seres humanos, o controle da replicação da *Leishmania* está associado ao desenvolvimento de linfócitos T específicos produtores de IFN- γ e TNF- α , capaz de controlar os parasitas pela ativação dos macrófagos infectados (BARRAL *et al.*, 1995). Já as citocinas IL-10 e TGF- β atuam como antagonistas da resposta inflamatória e estariam associadas à replicação dos parasitas nos macrófagos (BARRAL *et al.*, 1995; BOURREAU *et al.*, 2001; SALHI *et al.*, 2008). Em indivíduos com LCL, a resposta imune pode variar de predominantemente do tipo Th1 a uma resposta mista de tipo Th1 e tipo Th2 (SCHRIEFER *et al.*, 2008; CASTELLANO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Nos monócitos circulantes de pacientes com LCL, existe uma correlação positiva entre TNF e IL-10, quando um aumenta, o outro também aumenta, sugerindo que há um possível mecanismo de compensação (GAZE *et al.*, 2006). Durante a LCL, é possível observar por marcação direta a produção de TNF e IFN- γ por células T em lesões iniciais que tem associação direta com o tamanho da lesão (ANTONELLI *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Em estágios mais tardios, a quantidade de transcritos de IL-10 e TGF- β aumenta, talvez para conter os efeitos das citocinas inflamatórias (MELBY *et al.*, 1994; HEJAZI *et al.*, 2012).

Em indivíduos assintomáticos, a resposta Th1 não é tão robusta, produzindo baixa quantidade de citocinas inflamatórias (TNF e IFN- γ) e IL-10 pelas células mononucleares de sangue (BITTAR *et al.*, 2007).

Desse modo, com o objetivo de desenvolver uma estratégia que induzisse mecanismos tolerogênicos e fosse capaz de atenuar a resposta inflamatória exacerbada causada pela infecção por *Leishmania braziliensis*, optamos por testar o protocolo de tolerância oral.

1.5 TOLERÂNCIA ORAL

A tolerância oral (TO) é definida como um estado de supressão da reatividade imunológica frente a antígenos externos, que foram previamente administrados por via oral (VAZ *et al.*, 1977). Ela é considerada um evento imunológico natural, pois ocorre diariamente com inúmeras proteínas exógenas ingeridas na alimentação. A microbiota comensal do intestino, que está em contato diretamente com a mucosa, forma uma barreira, impedindo que os componentes estranhos penetrem no intestino. Desse modo, a tolerância oral é uma forma de tolerância periférica que permite que antígenos exógenos sejam reconhecidos como componentes internos através do contato contínuo por via oral (FARIA e WEINER, 2005, 2006).

A tolerância oral afeta de diferentes maneiras vários parâmetros imunológicos, o que demonstra a grande importância deste fenômeno nas respostas imunes desenvolvidas pelo organismo (**Tabela 2**). Através da TO, o organismo é capaz de induzir a diferenciação de células T antígeno-específicas produtoras de citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- β , e assim suprimir respostas imunes pró-inflamatórias (FARIA e WEINER, 2005).

Tabela 2. Principais parâmetros imunológicos modulados pela tolerância oral

Inibição intensa da produção de imunoglobulinas (IgM, IgG e IgE)	Faria & Weiner, 2006
Redução na resposta proliferativa de linfócitos T específicos	Simioni <i>et al.</i> , 2004
Supressão da reação de hipersensibilidade tardia ou DTH	Goubier <i>et al.</i> , 2008
Inibição da produção de citocinas inflamatórias secretadas por linfócitos Th1	Awasthi <i>et al.</i> , 2007

Existem três mecanismos efetores principais relacionados com a tolerância oral: (i) anergia, (ii) deleção clonal e (iii) indução de células T reguladoras. Após ingestão, o antígeno oral pode alcançar o tecido linfóide associado ao intestino de várias formas. O antígeno pode ser capturado pelos processos das células dendríticas que penetram no lúmen, através das células M, ou ser absorvido pelas células epiteliais intestinais. Quando utilizadas baixas doses de antígenos, estes são capturados pelas DCs que possuem um perfil tolerogênico, migram para o linfonodo mesentérico e favorecem a indução de diferentes tipos de Tregs no intestino, como iTregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, nTregs, células Tr1, Tregs LAP^+ (células Th3), Treg $CD8^+$ s e células T $\gamma\delta$. Por outro lado, doses elevadas de antígenos favorecem anergia/ deleção como mecanismo de indução de tolerância. O fígado também apresenta um papel na indução de tolerância oral, altas doses de antígeno podem ser rapidamente absorvidas pelo fígado, processadas pelas DCs e induzir anergias e deleções de linfócitos T (**Figura 4**).

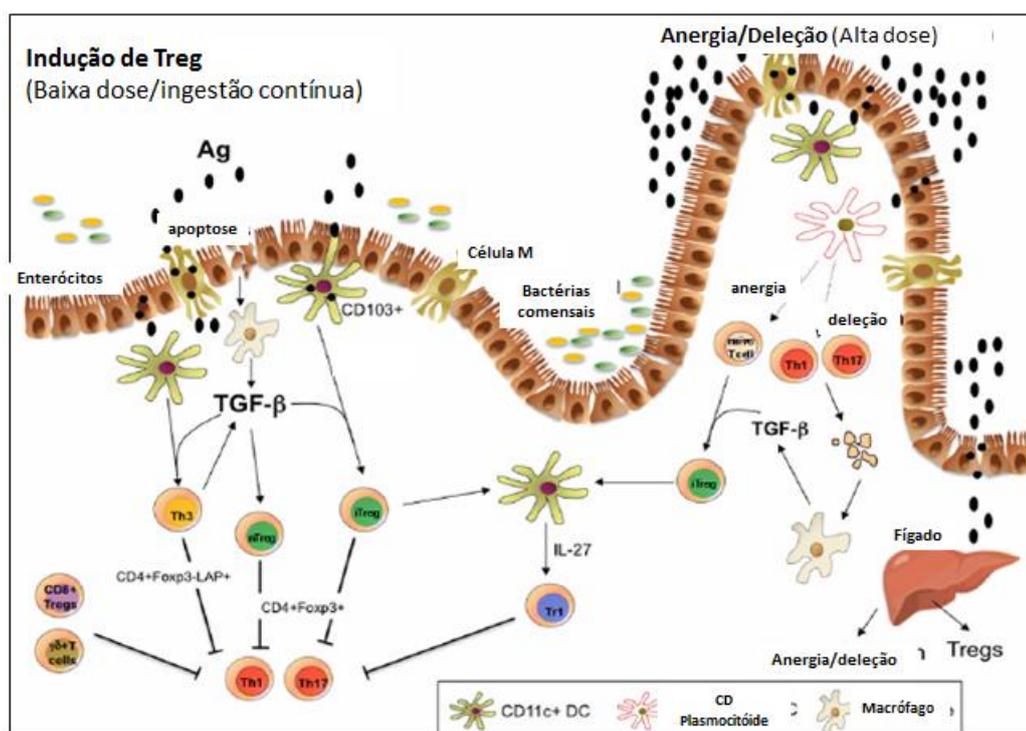


Figura 4. Mecanismos de indução de tolerância oral (Adaptado de WEINER *et al.*, 2005)

Já está bem estabelecido que a indução de tolerância oral é diretamente dependente da dose de antígeno administrada. Como demonstrado previamente, baixas doses de antígeno são capazes de induzir a diferenciação de células T regulatórias produtoras de citocinas modulatórias como TGF- β e IL-10, e assim suprimir respostas inflamatórias, além de mimetizar o que ocorre naturalmente, já que ingerimos pequenas quantidades de proteína

ao longo do dia. Por outro lado, altas doses de antígenos parecem favorecer a deleção clonal ou anergia de células T específicas do tipo Th1 e Th2 (**Figura 5**) (CHEN *et al.*, 1995; MARTH *et al.* 1996; MEYER *et al.*, 2001; MOWAT *et al.*, 1982; WHITACRE *et al.*, 1991; MELAMED e FRIEDMAN., 1993; FRIEDMAN e WEINER., 1994; INADA *et al.*, 1997). Esses diferentes tipos de mecanismo podem também se sobrepor e não são excludentes (MILLER *et al.*, 1992; FARIA e WEINER, 2006).

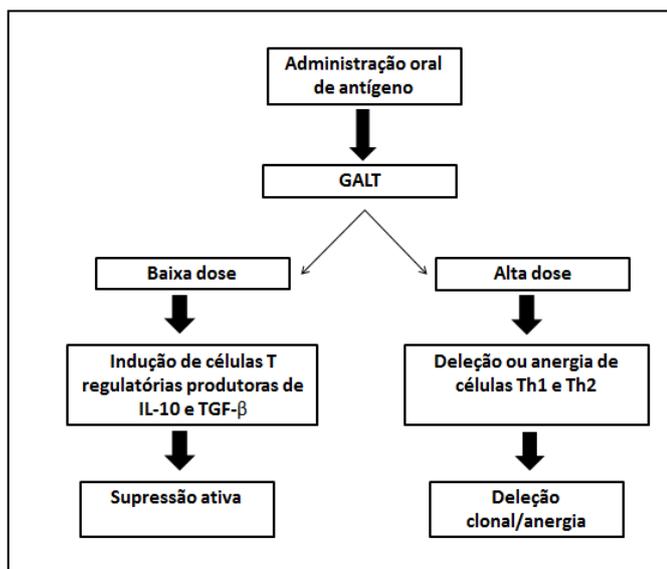


Figura 5. Mecanismos de tolerância oral por baixa e alta dose (adaptado de HYUN e BARRETT, 2006)

A indução da tolerância oral vem sendo testada em vários modelos experimentais de doenças autoimunes, assim como outras condições inflamatórias, onde busca-se um antígeno alvo específico para a indução de tolerância. Porém, tem sido demonstrado a possibilidade de ocorrência do fenômeno de supressão cruzada, no qual as células reguladoras que foram induzidas por antígenos da dieta, por exemplo, são capazes de inibir a resposta imune estimulada por outros antígenos, através da secreção de citocinas não específicas (FARIA & WEINER, 2005). Assim, para uma doença inflamatória de um órgão específico, poderia ser utilizado um antígeno capaz de induzir células reguladoras não específicas, que serão capazes de migrar para o tecido alvo e suprimir a inflamação, sem a necessidade adicional do antígeno específico (FARIA e WEINER, 2006).

Além das células T CD4⁺, as células T reguladoras (Tregs) possuem papel fundamental na indução de tolerância oral. As células Tregs foram descritas primeiramente na década de 70, denominadas como células supressoras constituídas de células T CD8⁺.

Posteriormente, essas células foram identificadas como sendo $CD4^+CD25^+$ (SAKAGUCHI *et al.*, 1995). O CD25 é a cadeia alpha do receptor da IL-2, a qual demonstrou-se ser fundamental na função reguladora desse tipo celular (SAKAGUCHI *et al.*, 2008). Atualmente, sabe-se da existência de diferentes subtipos de células Tregs: (i) Tregs naturais ($CD25^+Foxp3^+$), (ii) Tregs induzidas ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$), (iii) Tregs Th3 dependentes de TGF- β (LAP – *Latency Associated Peptide*), (iv) células do tipo Tr1 e (v) Tregs $CD8^+$. Todos os subtipos celulares de Tregs podem ser ativados ou induzidos por diferentes antígenos administrados por via oral. O Foxp3 (“*forkhead box protein 3*”) é um fator de transcrição nuclear chave envolvido no desenvolvimento de células Tregs naturais derivadas do timo. O LAP é um pro-peptídeo ligado à superfície celular, que está associado não covalentemente ao domínio amino-terminal do TGF- β , formando um complexo TGF-latente. As células Tregs do tipo Tr1, produtoras de IL-10, tem papel na indução de tolerância e são preferencialmente induzidas por baixa dose de antígenos via nasal (TSUJI *et al.*, 2001; LI e FLAVELL, 2008).

As células Tregs são geradas como resultado da apresentação de antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) presentes na mucosa, que induzem preferencialmente a produção de TGF- β , IL-10 e IL-4 (VINEY *et al.*, 1998; SIMIONI *et al.*, 2004). Posteriormente, as Tregs migram para os órgãos linfóides, inibindo a geração de células efetoras e suprimindo a resposta imunológica através da liberação de citocinas anti-inflamatórias não específicas (FARIA e WEINER, 1999; 2005; 2006). Alguns autores demonstraram que os linfonodos mesentéricos encontrados no intestino tem importância relevante para a indução de tolerância oral. Moléculas de superfície de células Tregs, assim como mediadores inibitórios podem agir desativando as APCs que tentam ativar células T efetoras (KRAUS *et al.*, 2005; SPAHN *et al.*, 2001; 2002).

As células dendríticas encontradas no intestino, mais precisamente do tipo $CD103^+$ possuem propriedades que levam à indução de células Tregs $CD4^+Foxp3^+$, a partir das células precursoras $Foxp3^-$. Uma das características das células Tregs do tipo Th3 induzidas na mucosa é a expressão de LAP na superfície celular. Quando essa forma precursora é liberada da célula, enzimas como a trombospondina-1 agem na clivagem do LAP e o TGF- β ativo é liberado (WEINER *et al.*, 2011; OIDA *et al.*, 2003). No modelo de encefalomielite experimental autoimune (EAE), as células Th3 foram identificadas como células supressoras após a indução de tolerância oral utilizando o antígeno de mielina. Foi observado que as células Th3 estariam atuando através da produção de TGF- β (MILLER *et al.*, 1992). Outros autores demonstraram também que o TGF- β é capaz de induzir a expressão de LAP em células $TCD4^+$, independente da indução de Foxp3 (OIDA & WEINER, 2010).

Em um modelo experimental de colite foi identificado uma população de linfócitos T com o fenótipo CD4⁺CD25⁻LAP⁺ no baço de camundongos (OIDA *et al.*, 2003).

Mais recentemente, diferentes estudos de Weiner e colaboradores (2011), demonstraram que as células Th3 seriam células do tipo CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻LAP⁺ presentes em órgãos linfoides periféricos, que seriam ativadas no intestino por sinalização via receptor de células T (TCR), induzida por antígenos administrados por via oral. Esse processo, então, aumentaria suas propriedades regulatórias e daria início à cascata regulatória intestinal. As células Th3 Foxp3⁻ produzem TGF-β, que pode agir de diversas formas, na manutenção de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ naturais, além de agir em células Foxp3⁻, convertendo-as em Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺LAP⁻ induzidas. Por outro lado, o TGF-β, juntamente com a IL-6, é capaz de induzir uma resposta do tipo Th17, além de suprimir as respostas do tipo Th1 e Th2, gerando uma resposta inflamatória sistêmica. Acredita-se que as células Tregs Th3, induzidas no intestino, possam migrar em direção a um estímulo infeccioso e então desempenhar propriedades imunoregulatórias generalizadas, como a indução de tolerância infecciosa (WEINER *et al.*, 2011).

Assim, as bactérias lácticas da espécie *Lactococcus lactis* poderiam ser uma importante ferramenta para induzir os mecanismos regulatórios na mucosa, funcionando como vetor e liberando lentamente o antígeno nesse sítio, gerando células reguladoras capazes de atenuar os efeitos inflamatórios da infecção por *Leishmania braziliensis*.

1.6 BACTÉRIAS LÁCTICAS E *LACTOCOCCUS LACTIS*

As bactérias ácido lácticas (BL) são amplamente utilizadas na indústria de alimentos como, por exemplo, queijos, iogurtes e leites fermentados. Elas recebem essa nomeação por serem um grupo de bactérias Gram-positivas, não patogênicas, e terem como principal produto metabólico o ácido láctico, resultado da fermentação de carboidratos. Diversas espécies de bactérias lácticas, por serem utilizadas em processos de fermentação de alimentos, já foram consideradas seguras e adquiriram o status de GRAS (*Generally Recognized As Safe*). As principais espécies que compõem o grupo são *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus*, *Streptococcus* e *Lactococcus*, dentre outras. Algumas espécies também fazem parte da microbiota normal humana (STEIDLER e ROTTIERS, 2006; WELLS e MERCEINER, 2008; DE VRESE *et al.*, 2001; CARR *et al.*, 2002).

Mais recentemente, o uso das bactérias lácteas como vetores vivos para a apresentação e entrega de antígenos ou de DNA na superfície das mucosas vem sendo

amplamente estudado (MIYOSHI *et al.*, 2004). Diversos trabalhos já avaliaram a utilização destas bactérias, entre elas os *Lactobacillus sp* e os *Lactococcus sp*. Neste sentido, diferentes sistemas de expressão empregando BL já foram desenvolvidos para a produção e liberação controlada e direcionada de antígenos na mucosa gastrointestinal (PONTES *et al.*, 2011). Ao contrário dos microorganismos patogênicos, as BL podem ser continuamente utilizadas em programas de imunização, já que não possuem LPS em sua parede celular, o que elimina os riscos de reações adversas decorrentes de choque séptico por endotoxina (MERCENIER *et al.*, 2000).

A bactéria *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) é a espécie mais bem caracterizada do gênero, sendo bastante empregada por ser a primeira bactéria láctea com genoma completamente sequenciado. Além disso, *L. lactis* são bactérias Gram-positivas, mesófilas, não invasivas, que não produzem endotoxinas ou qualquer outro produto metabólico tóxico, e secretam um número reduzido de proteínas (BOLOTIN *et al.*, 2001). Por possuir uma variedade de ferramentas genéticas já desenvolvidas, *L. lactis* é uma das bactérias mais amplamente utilizada na indústria de laticínios, sendo uma espécie de fácil manipulação e de classificação GRAS (BOLOTIN *et al.*, 2001; STEIDLER *et al.*, 1998; STDEIDLER e ROTTIERS, 2006; WELLS e MERCENIER, 2008).

No final da década de 90, Steidler e colaboradores desenvolveram a primeira cepa de *L. lactis* geneticamente modificada, capaz de produzir e secretar citocinas como IL-2, IL-6 e IL-10, testadas em diversos modelos experimentais (STEIDLER *et al.*, 1998). A bactéria modificada para produzir IL-10 foi a mais bem sucedida, sendo capaz de prevenir a colite experimental induzida por DSS (dextran sulfato de sódio) em camundongos deficientes para IL-10 (STEIDLER *et al.*, 2000).

O grupo de Faria e colaboradores demonstrou, em diferentes modelos experimentais, que a ingestão contínua é o modo mais eficaz de se induzir tolerância oral. Esse protocolo de administração oral foi capaz de induzir tolerância em camundongos idosos e refratários à indução por gavagem à ovalbumina (FARIA *et al.*, 1998). Em outro estudo utilizando esta mesma abordagem experimental, o grupo mais uma vez observou que a tolerância oral foi capaz de inibir de forma eficaz o surgimento de encefalomielite autoimune experimental (FARIA *et al.*, 2003). Posteriormente, como uma alternativa desenvolvida para mimetizar os efeitos da ingestão contínua de antígenos, procedeu-se ao uso de bactérias lácticas geneticamente modificadas produtoras de proteínas heterólogas. As bactérias são capazes de liberar de forma lenta e gradual o antígeno na mucosa, tendo o potencial promissor de reproduzir em humanos os efeitos que foram demonstrados em modelos experimentais de

tolerância oral por ingestão contínua voluntária (ROTTIERS *et al.*, 2009). Neste sentido, a capacidade de *L. lactis* em induzir tolerância oral foi avaliada, utilizando-se a bactéria modificada geneticamente para produzir ovalbumina (LI-Ova). Observou-se que a bactéria secretora induziu aumento de IL-10 após o estímulo com o mesmo antígeno, tanto pelo tecido linfóide associado à mucosa como pelo baço, além de promover a geração de células Treg induzidas (HUIBERGTSE *et al.*, 2007; MAILLARD e SNAPPER, 2007).

1.7 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPS)

As proteínas de choque térmico ou *Heat Shock Proteins* (Hsps) constituem uma classe funcional de proteínas encontradas em todos os organismos vivos, desde bactéria a seres humanos, e cuja expressão é aumentada quando as células são expostas a elevadas temperaturas ou outros tipos de estresse. Em condições normais, elas também são encontradas em baixas quantidades e desempenham papel vital no funcionamento da célula (LINDQUIST e CRAIG, 1988; ELLIS, 1990). Essas proteínas são altamente homólogas entre as diferentes espécies, provavelmente por exercerem funções básicas na manutenção da célula, sendo consideradas “chaperonas” intracelulares. Possuem um papel importante na reciclagem celular de proteínas, pois favorecem a destruição por proteassomas (BORGES e RAMOS, 2005; WALTER e BUCHNER, 2002), e participam das vias de sinalização de sobrevivência da célula (CHUN *et al.*, 2010).

As Hsps são classificadas de acordo com seu peso molecular em kilodaltons (kDa), sendo as mais estudadas a Hsp60, Hsp70 e Hsp90, referem-se aos pesos de 60, 70 e 90 kDa, respectivamente (ELLIS, 1990). Elas podem estar presentes tanto na parede celular, como serem secretadas pela célula, apesar de serem consideradas proteínas citosólicas (GULLO e TEOH, 2004). Quando secretadas ou associadas à membrana são capazes de interagir com células do sistema imune mediando respostas imunológicas (SCHMITT *et al.*, 2007).

Contudo, uma das funções mais importantes das Hsps está relacionada com sua influência na regulação do sistema imune (NISHIKAWA *et al.*, 2008). As Hsps podem ativar o sistema imune através de diversos receptores de superfície, como TLR2, TLR4, CD14, CD91 e CD40 (BINDER *et al.*, 2004). A HSP60, por exemplo, parece afetar a inflamação por dois mecanismos diferentes: (i) como ligante para receptores da imunidade inata, como os receptores do tipo Toll 2 (TLR-2) (ZANIN-ZHOROV *et al.*, 2006), levando à inibição na migração de células T e consequente redução da entrada dessas células no sítio inflamatório

(ZANIN-ZHOROV *et al.*, 2003, 2005), e (ii) como antígeno reconhecido por receptores da imunidade adaptativa (QUINTANA *et al.*, 2008). Após a ligação ao TLR-2, a HSP60 leva ao aumento na produção de IL-10 e redução de IFN- γ e TNF- α pelas células T (ZANIN-ZHOROV *et al.*, 2003, 2005). Outros trabalhos demonstraram que a HSP60 possui papel importante tanto na sobrevivência quanto na função de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (ZANIN-ZHOROV *et al.*, 2006), além de induzirem a diferenciação de células T CD4⁺CD25⁻ em células T reguladoras CD4⁺CD25^{high} derivadas de pacientes com artrite idiopática juvenil (JIA) (VAN EDEN *et al.*, 2005; DE KLEER *et al.*, 2004). Também foi demonstrado em modelo experimental de artrite que a HSP70 proveniente de micobactérias exerce importantes funções imunorregulatórias (VAN EDEN *et al.*, 2005). Além disso, a administração oral de Hsp65 derivada do *Mycobacterium leprae*, proteína homóloga a Hsp60 dos mamíferos, também mostrou ser capaz de induzir tolerância oral e promover proteção contra aterosclerose em camundongos (MARON *et al.*, 2002; HARATS *et al.*, 2002) e artrite adjuvante em ratos (COBELENS *et al.*, 2002).

Baseado em todos esses trabalhos, as Hsps, parecem ser importantes candidatas para a indução de células T reguladoras, tornando-se uma potencial alternativa para o uso terapêutico da tolerância oral em doenças inflamatórias e autoimunes (REZENDE *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose cutânea é caracterizada por uma lesão de bordas elevadas com fundo necrótico, e presença de infiltrado inflamatório com poucos parasitas. Embora citocinas inflamatórias sejam fundamentais para a destruição do parasita, sua presença, sem um sistema adequado de regulação leva a formação da lesão. Assim, é importante encontrar-se o equilíbrio entre a inflamação e a regulação da resposta imune com a finalidade de se destruir o parasita e diminuir o ambiente inflamatório induzido pela infecção. Neste contexto, as células reguladoras e citocinas imunomodulatórias possuem papel crucial na redução dos efeitos inflamatórios.

Nos últimos anos, a tolerância oral tem sido utilizada com sucesso em vários modelos experimentais de doenças autoimunes, tais como encefalomielite alérgica experimental (EAE), diabetes e artrite, bem como em outras condições inflamatórias tais como colite e alergias. Seu uso leva à supressão da resposta imune pró-inflamatória através da indução de células T antígeno-específicas secretoras de diferentes citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (FARIA e WEINER, 2005).

Desse modo, as proteínas de choque térmico (Hsps), reconhecidas como antígenos próprios, podem servir como candidatas promissoras para a indução de mecanismos reguladores. Uma das funções mais promissoras das Hsps está relacionada com a sua capacidade de regulação do sistema imune, sendo alternativas promissoras para o tratamento de doenças inflamatórias e autoimune (REZENDE *et al.*, 2013). Estudos têm demonstrado que *Lactococcus lactis* recombinantes produtores de HSP65 possuem atividade imunorreguladora capaz de induzir tolerância oral e promover proteção contra aterosclerose, encefalomielite e colite em camundongos (MARON *et al.*, 2002; HARATS *et al.*, 2002; REZENDE *et al.*, 2013; GOMES-SANTOS *et al.*, 2017) e artrite adjuvante em ratos (COBELENS *et al.*, 2002) através da indução de tolerância oral.

Assim, com o objetivo de desenvolver uma estratégia que induzisse mecanismos tolerogênicos e atenuasse a resposta inflamatória exacerbada causada pela infecção por *Leishmania braziliensis*, utilizamos um método de entrega da Hsp65 derivada da *Mycobacterium leprae* diretamente no intestino, desenvolvido pelo grupo de Miyoshi e colaboradores em 2004 (UFMG) e cedido pelo grupo de Dra. Ana Caetano Faria (UFMG).

3. HIPÓTESE

A administração oral de *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65, com e sem adjuvante (PAM3CSK4), em camundongos BALB/c contribui para a atenuação da inflamação em animais infectados por via intradérmica com *Leishmania braziliensis*

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o potencial imunomodulatório da administração oral de *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65, com e sem adjuvante, no modelo experimental de leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania braziliensis* em camundongos BALB/c.

4.2 ESPECÍFICOS

4.2.1. Avaliar se a administração de *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 com e sem adjuvante antes da infecção por *Leishmania braziliensis* interfere:

- a) Na inflamação causada pela infecção por *L. braziliensis*;
- b) No desenvolvimento da lesão e carga parasitária após a infecção por *L. braziliensis*;
- c) Na produção de citocinas imunomodulatórias pelos órgãos linfoides;
- d) Na expressão de marcadores envolvidos com a indução de tolerância oral;
- e) No perfil de células recrutadas para o sítio inflamatório.

5. DESENHO EXPERIMENTAL

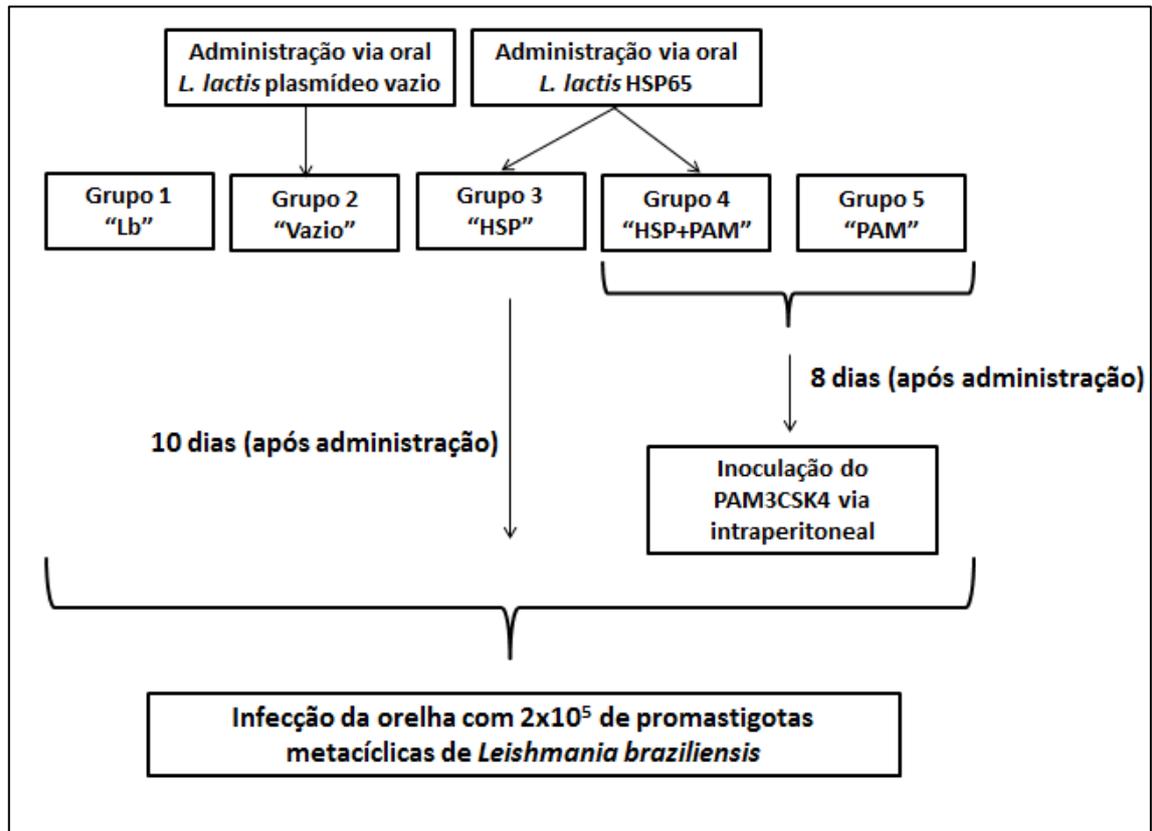


Figura 6. Desenho experimental dos estudos *in vivo*

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 ANIMAIS

Para os experimentos *in vivo*, foram utilizados 360 camundongos BALB/c fêmeas (*Mus musculus*), com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério do Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BAHIA, sendo 120 animais por experimento (repetido 3x). Os animais foram mantidos à temperatura ambiente, com ração comercial apropriada e água *ad libitum* em microisoladores apropriados para criação. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA), protocolo de aprovação N° 006/2013.

6.2 LINHAGENS BACTERIANAS E ACONDICIONAMENTO BIOLÓGICO

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho estão listadas na **Tabela 3**. O meio de cultivo utilizado para o crescimento de *L. lactis* foi o M17 (Difco, USA), suplementado com 0,5% de glicose (Merck) ou 1% de xilose (GM17 ou XM17, respectivamente). Para o cultivo das bactérias, 10µg/ml do antibiótico cloranfenicol (Sigma) foi adicionado. As bactérias foram crescidas a 30 °C sem agitação. A HSP65 produzida por *L. lactis* não contém LPS. Além disso, foi estimado por *Western Blotting* que o *L. lactis* produtor de HSP na forma secretada (*L. lactis*pSEC) produz cerca de 7mg/l de HSP65 (AZEVEDO, 2009).

Os meios de cultura e as soluções utilizadas para o cultivo do *L. lactis* foram:

- **Glicose** (40% p/v): 40g de Glicose (Merck) foram dissolvidas em uma quantidade suficiente para 100 ml de água pura. Em condições de esterilidade, a solução foi filtrada utilizando filtro de 0,22 µm (Corning), aliqüotada e posteriormente acondicionada a 4 °C.
- **Xilose** (25% p/v): 25 g de xilose foram dissolvidas em 100 ml de água ultrapura. Em condições de esterilidade, a solução foi filtrada utilizando filtro de 0,22 µm (Corning), aliqüotada e em seguida acondicionada a - 20 °C.
- **Cloranfenicol** (10mg/ml): 100 mg de cloranfenicol (Sigma) foram dissolvidos em 10 ml de álcool etílico PA (Merck). Dentro do fluxo laminar, a solução foi filtrada utilizando filtro de 0,22 µm (Corning), aliqüotada e em seguida acondicionada a - 20 °C.

- **M17 líquido:** 37,5 g de M17 foram pesados em balança analítica, e em seguida dissolvidos em 950 ml de água ultrapura. A solução foi homogeneizada utilizando um agitador magnético, e o pH foi ajustado para 6,9 antes da esterilização durante 15 minutos a 120 °C.
- **M17 + Glicose (GM17):** Meio M17 acrescido de Glicose 0,5% estéril.
- **M17 + Xilose (XM17):** Meio M17 acrescido de Xilose 1% estéril.

Tabela 3: Linhagens bacterianas utilizadas.

Espécie	Linhagem	Fonte
<i>L. lactis</i> NCDO2118	<i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais
<i>L. lactis</i> pSEC: <i>HSP65</i>	<i>L. lactis</i> NCDO2118 portadora do vetor de expressão pXyIT:SEC: <i>HSP65</i> /Cm ^r contendo a sequência codificadora do peptídeo sinal da proteína <i>Usp45</i> (SP _{Usp}) de <i>L. lactis</i> fusionada à ORF <i>HSP65</i> de <i>M. leprae</i> sob o controle do promotor P _{xyIT}	Rocha, 2007

Cm^r: Resistência ao antibiótico cloranfenicol

ORF: Open Reading frame (Sequência de leitura aberta)

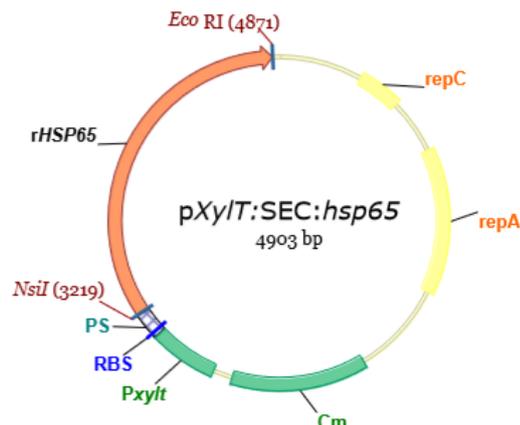


Figura 7. Representação dos vetores de expressão pXyIT:SEC:Hsp65. PxyIT: Promotor induzido por xilose. RBS: Sítio de ligação do ribossomo da sequência codificadora da proteína *Usp45* de *L. lactis*. PS: Peptídeo sinal da proteína *Usp45*. *NsiI* e *EcoRI*: Sítio para as enzimas de restrição *NsiI* e *EcoRI*. rHSP65: ORF HSP65 de *M. leprae*. repA e repC: Origens de replicação. Cm: Gene que confere resistência ao cloranfenicol. Fonte: AZEVEDO, 2009.

6.3 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM *L. LACTIS*

Dois processos foram necessários para a indução da expressão da proteína de interesse pela bactéria: (1) o inóculo, feito para estimular a proliferação bacteriana e (2) o induzido no qual ocorre a indução da expressão da proteína de interesse que será expressa pela bactéria geneticamente modificada.

Dia 1: Inóculo

Colônias isoladas de *L. lactis*SEC:HSP65 e *L. lactis*NCDO2118 contendo plasmídeo vazio (10 µl) foram individualmente inoculadas em 5 ml de meio GM17 (meio de cultura M17 acrescido de glicose) suplementado com cloranfenicol na concentração de 10 µg/ml. Os inóculos permaneceram em estufa a 30 °C por 24 horas, sem agitação. O inóculo foi preparado sempre no horário entre 16-18:00 horas.

Dia 2: Indução

Após incubação *overnight*, as culturas crescidas foram diluídas (1:10.000) em meio XM17 (meio e cultura M17 acrescido de xilose) em volume determinado em função do número de animais a serem tratados, levando-se em consideração que cada animal ingere uma média de 5 ml de líquido por dia (7mg/ml de HSP65). A indução também foi realizada sempre no horário entre 16-18:00 horas, em condições de esterilidade.

Dia 3-6: Administração oral

As culturas de bactérias em meio M17 foram acondicionadas em mamadeiras de vidro estéreis para administração aos camundongos. A administração oral foi realizada por 4 dias consecutivos, e as mamadeiras trocadas a cada 24 h, seguindo o protocolo já estabelecido por Gomes-Santos *et al.*, 2017 e Rezende *et al.*, 2013.

6.4 ADMINISTRAÇÃO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Camundongos BALB/c receberam por via oral as diferentes linhagens de *L. lactis*, considerando-se a ingestão de 5 ml/dia de líquido para cada animal. A administração das bactérias foi realizada 10 dias antes da infecção com *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*). Em 2 grupos (um que recebeu Hsp65 e outro não) foram administradas uma dose intraperitoneal de 20 ug de PAM3CSK4 (InvivoGen), 48 horas antes da infecção.

Em resumo, os animais foram aleatoriamente distribuídos em grupos de 5 animais cada, conforme abaixo descrito:

Grupo 1 (Lb): Camundongos infectados com *Leishmania braziliensis*.

Grupo 2 (Vazio): Camundongos administrados com o “plasmídeo vazio” de *L. lactis* e infectados com *Leishmania braziliensis* 10 após a administração.

Grupo 3 (HSP): Camundongos administrados com *L. lactis* produzindo a forma secretada do antígeno (*L. lactis*pSEC:HSP65) e infectados com *Leishmania braziliensis* 10 dias após a administração.

Grupo 4 (HSP+PAM): Camundongos administrados com *L. lactis* produzindo a forma secretada do antígeno (*L. lactis*pSEC:HSP65), que foram inoculados com PAM3SCK4 (48 horas antes da infecção) e infectados com *Leishmania braziliensis* 10 dias após a administração.

Grupo 5 (PAM): Camundongos inoculados com PAM3CSK4 (48 horas antes da infecção) e infectados com *Leishmania braziliensis*.

6.5 PARASITAS

As promastigotas de *Leishmania braziliensis* (cepa MHOM/BR/01/BA788) utilizadas nos experimentos foram cultivadas em meio Schneider (Sigma Chemical Co., St

Loius, MO, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco, USA), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) a 23 °C por aproximadamente 7 dias, quando os parasitas atingem a fase estacionária. Para garantir a virulência, só foram utilizados parasitas até a 5ª passagem.

6.6 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Dez dias após a administração oral do *L. lactis*, os camundongos foram desafiados na orelha esquerda por via intradérmica (i.d.), utilizando-se seringas com agulha 30G, com uma concentração de 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis*, na fase estacionária de crescimento, em um volume final de 10 µl de solução salina 0,9%. As formas metacíclicas foram purificadas utilizando a lectina *Bauhinia purpúrea*, como previamente descrito (Pinto-da-Silva *et al.*, 2002). Os animais dos grupos controle, que receberam o pré-tratamento com *L. lactis*, também receberam o desafio com *L. braziliensis*. A espessura das lesões na orelha foi mensurada semanalmente, utilizando um paquímetro digital (Thomas Scientific, USA).

6.7 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

A carga parasitária foi determinada pelo ensaio de diluição limitante, como previamente descrito (BELKAID, *et al.*, 1998). Os animais foram eutanasiados nos períodos de 2, 6, 10, e 12 semanas após a infecção, para extração dos linfonodos drenantes e orelhas infectadas. Após extração em condições de esterilidade, os órgãos foram macerados em 2 mL de meio Schneider utilizando peneira celular de (tamanho de poro de 40 µm) e posteriormente centrifugados a 1500 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos. O precipitado foi ressuscitado em 1 ml de RPMI Suplementado e diluído de forma seriada em placa de 96 poços com fundo chato, contendo meio Schneider suplementado. As placas foram seladas e incubadas a 25 °C durante 2 semanas. Os poços foram observados em microscópio óptico invertido, aumento 20X (Nikkon), de 3 em 3 dias, para o registro das diluições que continham promastigotas.

6.8 CULTURA DE CÉLULAS

Culturas foram realizadas a partir de células extraídas do baço, linfonodo drenante e linfonodos mesentéricos foram homogeneizadas e centrifugadas a 1500 rpm por 10

minutos a 4 °C. A lise das hemácias do baço foi realizada com tampão de lise (Sigma). As células foram novamente centrifugadas e ressuspendidas em meio RPMI 1640 pH 7,2 (LGC Biotecnologia), suplementado com 10% de soro bovino fetal, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml), HEPES (25 mM) (Sigma, St. Louis, Missouri) e β -mercaptoetanol (50 μ M) (Amersham Pharmacia Biotech). As células foram contadas em microscópio óptico e ajustadas para a concentração de 1×10^6 células/180 μ l em RPMI suplementado, adicionadas em placas de fundo chato (200 μ L), 96 poços, e re-estimuladas com promastigotas de *L. braziliensis* na concentração de 5×10^6 células/20 μ l (proporção de 5:1) ou com 5 μ g/mL de Concanavalina A (Sigma-Aldrich). Após 72 h de incubação em estufa a 37 °C, 5% CO₂, os sobrenadantes das culturas foram coletados para a dosagem de citocinas. Para os ensaios de citometria de fluxo, as células foram ativadas na presença de anti-CD3 e anti-CD28, posteriormente incubadas com Brefeldina A (10 μ g/ml) em estufa a 37 °C, 5% CO₂, e então coletadas para análise. Estes experimentos foram realizados em cada ponto de sacrifício.

6.9 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA

Os níveis das citocinas IL-10, IFN- γ , TGF- β e IL-4 foram determinados por ELISA nos sobrenadantes obtidos da cultura de células do baço e linfonodo drenante (MARON *et al.*, 1999). Para tal, foram utilizados anticorpos monoclonais (eBioscience) anti-IL-10, anti-IFN- γ , anti-TGF- β e anti-IL-4 murinos. Brevemente, placas de 96 poços de fundo chato (Nunc) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-citocina purificado na concentração determinada pelo fabricante. Após incubação por aproximadamente 18 h a 4 °C, os poços foram lavados com PBS contendo Tween 20 a 0,05%. Em seguida, realizou-se o bloqueio dos sítios de união inespecífica por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, as amostras e padrões foram adicionados e incubados por 2 h à temperatura ambiente. Para o TGF- β , foi feita a ativação das amostras em placas a parte, conforme descrito pelo fabricante do kit. Após lavagem, a placa foi incubada com o anticorpo de detecção conjugado com biotina por 1 h à T^a ambiente. Após esse período, a placa foi lavada novamente e incubada com estreptavidina conjugada com peroxidase por 30 minutos à T^a ambiente. Após a última lavagem, a placa foi incubada com tetrametilbenzidina (TMB) por 15 minutos, protegida da luz. A reação foi finalizada com ácido sulfúrico (2N) e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 450nm em leitor de ELISA (Molecular Devices Corp.; Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Softmax PRO (Molecular Devices,

Sunnyvale, CA, USA) e a curva de 4 parâmetros. Os limites de detecção de cada citocina foram, 32-4000pg/ml para IL-10, 15-2000pg/ml para IFN- γ , 8-1000pg/ml para TGF- β , 4-500pg/ml para IL-4 e 4-500pg/ml para IL-17.

6.10 DETECÇÃO DE CITOCINAS INTRACELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Células provenientes de linfonodos mesentéricos e drenantes de animais de cada grupo experimental foram bloqueadas com anticorpo anti-Fc block (2.4G2) durante 30 minutos e lavadas com 100 μ l/poço de PBS com SBF e centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos. Após descartar o sobrenadante, as células foram marcadas com anti-CD4 (RM4-4) e anti-LAP (TW7-16B4) e incubadas por 30 minutos a 4 °C, em ausência de luz. Após lavagem, foi realizada a marcação intracelular das citocinas e do Foxp3, as células foram permeabilizadas com Cytotfix/Cytoperm durante 20 minutos e incubadas com anticorpos anti-citocinas conjugados com diferentes fluorocromos. Utilizamos os seguintes anticorpos: anti-IL-10 (JES5-16E3), anti-IFN- γ (XMG1.2) e Foxp3 (FJK-16s). Um mínimo de 100.000 eventos foram adquiridos usando o citômetro de fluxo Fortessa (FACS, BD[®] Biosciences).

6.11 ANÁLISE DA CITOMETRIA DE FLUXO

A análise dos dados da citometria de fluxo foi realizada no programa Flow Jo[®]. Inicialmente, a região de linfócitos foi delimitada por tamanho e granulosidade (FSC-A x SSC-A). Dentro dessa região, selecionamos as células vivas, ou seja, as que não foram marcadas com o anticorpo *Live/dead*, e destas foram selecionados os linfócitos CD4⁺. A população positiva para os outros marcadores (IFN- γ ⁺, IL-10⁺, LAP⁺ e Foxp3⁺) foi selecionada em conjunto com o marcador de CD4⁺ (região duplo positiva). Os *Dot plots* representativos das estratégias de análise estão ilustrados nas a seguir (**Figura 7**).

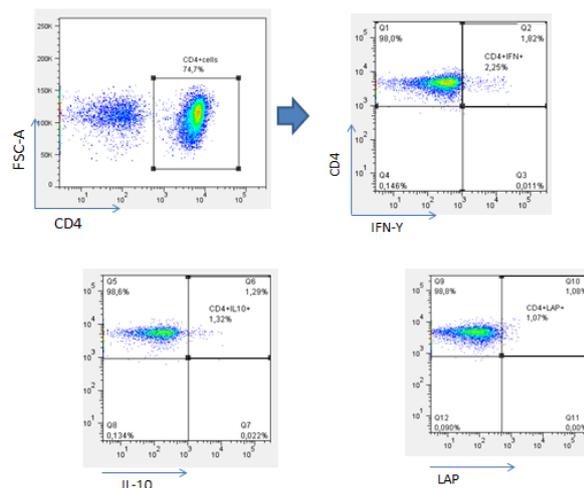


Figura 8. Dot plots das estratégias de gating para a análise das citocinas intracelulares por citometria de fluxo.

6.12 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA LESÃO

As orelhas infectadas foram removidas após a eutanásia dos animais nos tempos de 2, 6 e 10 semanas da infecção. Após 24 horas de fixação em formaldeído a 10%, as amostras foram processadas e embebidas em parafina para a confecção de cortes histológicos com secções de 5 μm de espessura, que foram corados com hematoxilina e eosina e posteriormente analisados por microscopia óptica. Cada parâmetro foi avaliado segundo presença ou ausência do evento através de escores: 0 (ausência), † (presença de 1-25%), †† (presença de 25-50%) e ††† (>50%). A análise dos parâmetros histopatológicos foi feita levando-se em conta os escores de cada animal. Orelhas de animais sadios foram utilizadas como controle negativo.

6.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, e analisados estatisticamente utilizando Análise de variância One-way (ANOVA), com pós-teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal-Wallis com pós-teste de *Dunns* para dados não-paramétricos, afim de calcular a significância entre os grupos. Os resultados foram apresentados com média aritmética ou mediana, e desvio padrão. Os testes foram realizados utilizando-se o Programa GraphPad Prism[®] versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Em todos os testes utilizados, a significância mínima foi aceita quando $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 LESÕES DE CAMUNDONGOS BALB/C ADMINISTRADOS COM *L. LACTIS* PRODUTOR DE HSP65 APÓS INFECÇÃO POR *L. BRAZILIENSIS*

Para avaliar se a administração de *L. lactis* produtor de Hsp65 era capaz de reduzir a inflamação causada pela infecção por *L. braziliensis*, acompanhou-se o aparecimento de lesões na orelha dos animais infectados. Nossos resultados mostraram que 6 semanas após a infecção (**Fig. 9a**), os grupos HSP e HSP+ PAM apresentaram uma resposta inflamatória menos intensa, do ponto de vista macroscópico. Após 10 semanas de infecção (**Fig. 9b**), este perfil persistiu nos grupos que foram pré-administrados com *L. lactis* produtor de Hsp65 (HSP e HSP+PAM), apresentando diminuição na inflamação das lesões comparada aos grupos controles (Lb, Vazio e PAM), e sem ulceração na maioria dos animais.

a



b

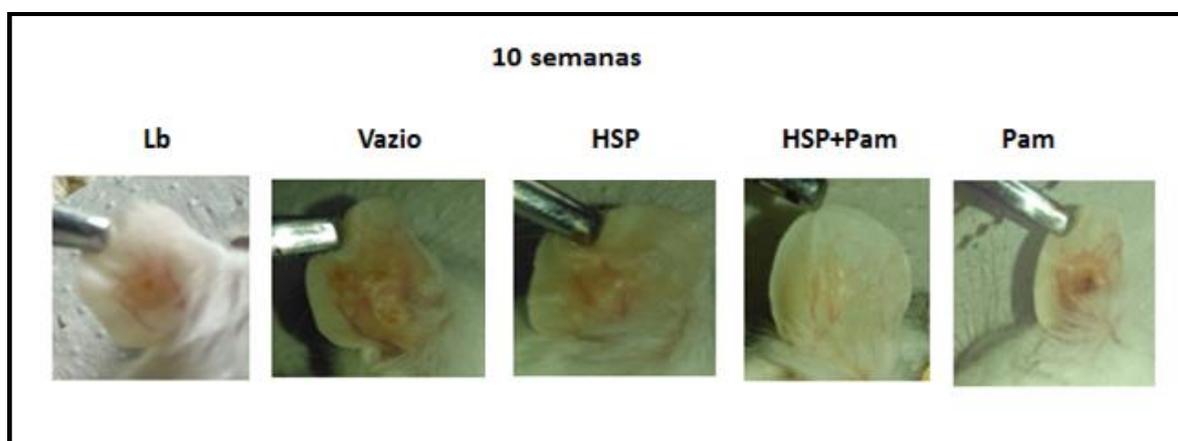


Figura 9. Desenvolvimento das lesões em camundongos BALB/c administrados com *L. lactis* produtor de HSP65 e infectados com *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* Hsp65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada 10

dias após a administração oral, através da inoculação intradérmica de 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária na orelha esquerda de camundongos BALB/c. Dois dias antes da infecção, os grupos HSP + PAM e PAM receberam administração intraperitoneal de PAM3CSK4. As lesões foram fotografadas com 6 (a) e 10 (b) semanas após a infecção. As fotos são representativas dos grupos de animais avaliados.

7.2 CINÉTICA DAS LESÕES DE CAMUNDONGOS BALB/C ADMINISTRADOS COM *L. LACTIS* PRODUTOR DE HSP65 APÓS INFECÇÃO POR *L. BRAZILIENSIS*

Com o objetivo de avaliar se a administração de *L. lactis* produtor de Hsp65 também era capaz de influenciar nas dimensões das lesões causadas pela infecção por *L. braziliensis*, foi realizada a mensuração semanal do tamanho das lesões nas orelhas dos animais infectados. Em todos os grupos experimentais, o início das lesões cutâneas dos animais ocorreu a partir da quarta semana pós-infecção. Os animais dos grupos HSP e HSP+PAM desenvolveram lesões menores durante todo o período acompanhado, e mostraram redução no tamanho quando comparados com os grupos controles Lb, Vazio e PAM entre a 7^a e 10^a semana após a infecção (**Fig. 10a**). A diferença nas espessuras das lesões entre os grupos HSP e Vazio mostrou-se estatisticamente significativa (evidenciado pelo *), assim como quando comparamos os grupos HSP+PAM e PAM (**Fig. 10b e c**).

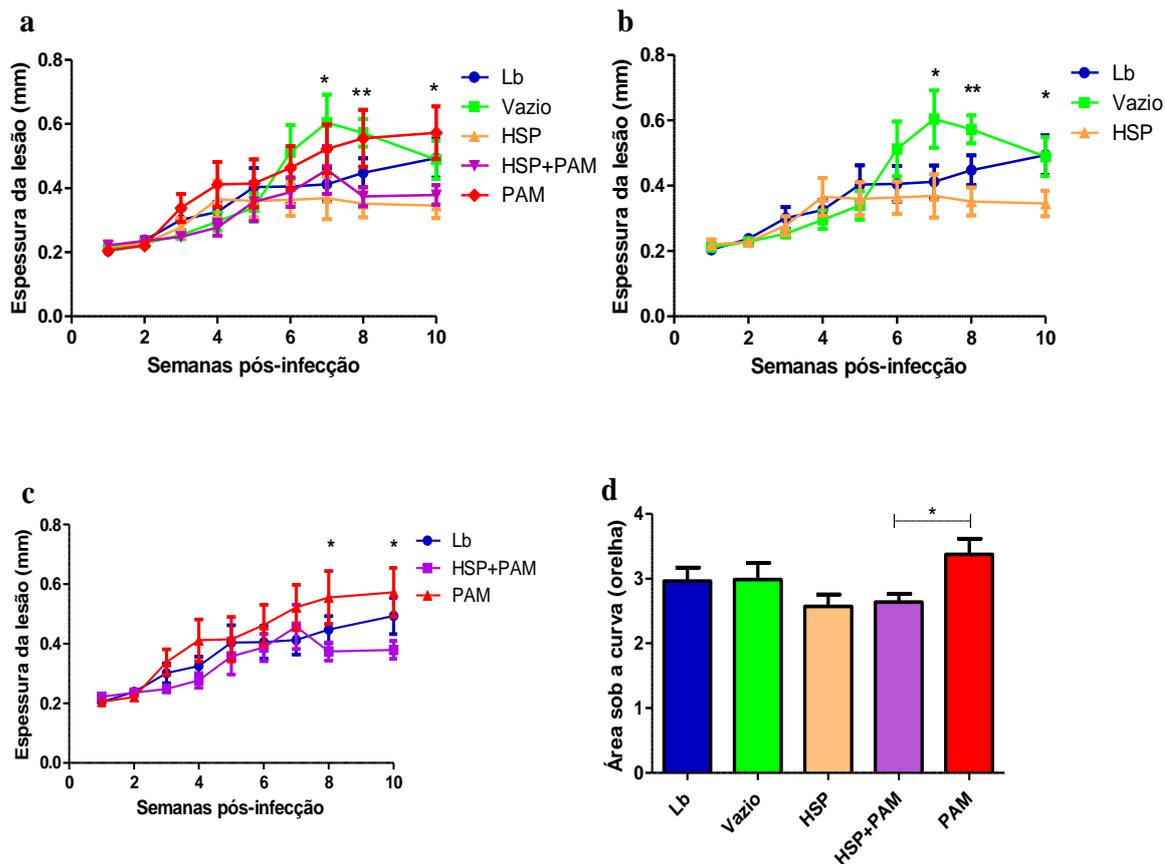


Figura 10. Cinética das lesões cutâneas em camundongos BALB/c administrados com *L. lactis* produtor de Hsp65 e infectados com *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* Hsp65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após a administração com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CK4 via intraperitoneal 48 horas antes da infecção. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que recebem *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que recebem *L. lactis* produtor de Hsp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que recebem *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que recebem PAM3CSK4 via i.p. (a-c): A espessura da lesão foi acompanhada com medições semanais utilizando paquímetro digital. Os dados representam as médias aritméticas \pm DP de cada grupo. As figuras b e c são provenientes da figura a, para facilitar a comparação. (d): A área sob a curva foi construída utilizando dados das medidas de lesão de cada grupo. Foi utilizado teste t de Student para comparação de dois grupos. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0.001$.

7.3 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA NO SÍTIO DE INOCULAÇÃO E NO LINFONODO DE DRENAGEM DA LESÃO EM CAMUNDONGOS BALB/C APÓS INFECÇÃO POR *L. BRAZILIENSIS*

Para avaliar se a espessura das lesões estava relacionada com o número de parasitos presentes no sítio de inoculação e no linfonodo de drenagem da lesão, a carga parasitária destes sítios foi determinada após 2, 6, 10 e 12 semanas após a infecção.

Nos animais que receberam o *L. lactis* produtor de Hsp65 (HSP), o número de parasitos na lesão se mostrou elevado nos tempos de 2 e 6 semanas (**Fig. 11a e 11b**) comparado aos grupos restantes. Porém, diferente dos animais que receberam *L. lactis* Vazio, os animais do grupo HSP foram capazes de controlar infecção e diminuir a carga parasitária ao final das 12 semanas (**Fig. 11d**). Esse mesmo padrão de carga foi observado quando o linfonodo drenante foi avaliado. Já o grupo HSP+PAM, desde o início da infecção apresentou baixas cargas parasitárias, tanto na lesão quanto no linfonodo drenante, durante todo o período avaliado. No tempo de 12 semanas (**Fig. 11d**) os grupos Lb e Vazio ainda apresentavam parasitas na lesão, mostrando que a administração de *L. lactis* Vazio não interferiu na carga parasitária. Entretanto, o grupo que recebeu somente PAM, apresentou baixa carga parasitária durante o período analisado, demonstrando que o tamanho da lesão estava diretamente relacionado à resposta inflamatória neste grupo (**Figuras 10a e 11c e d**), bem como na aparência da lesão (**Figura 9b**).

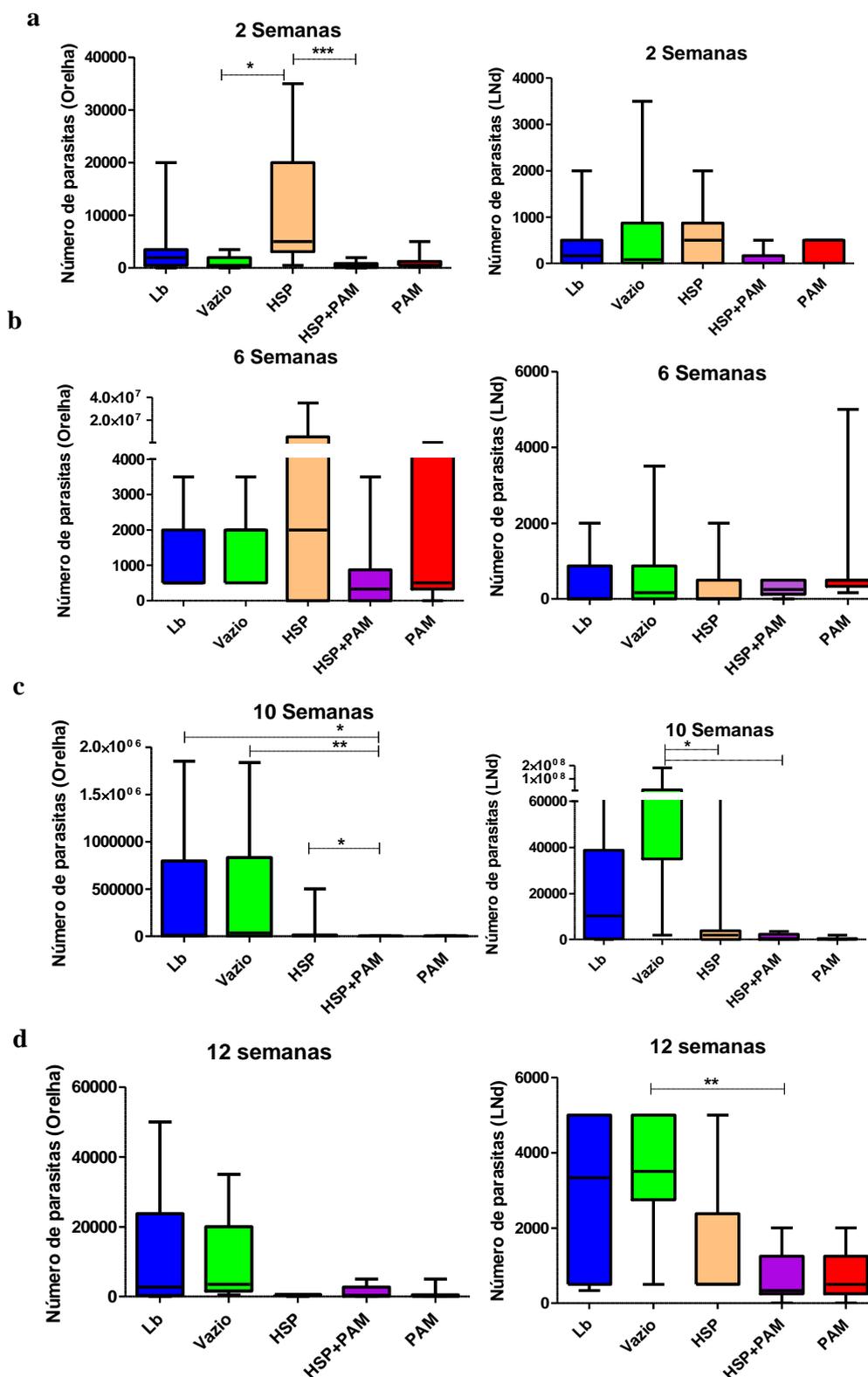


Figura 11. Avaliação da carga parasitária no sítio de inoculação e no linfonodo de drenagem da lesão em camundongos BALB/c após infecção por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* Hsp65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após o pré-tratamento com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária pela via intradérmica. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CSK4 via intraperitoneal 48 horas antes da infecção. Os animais foram eutanasiados com 2, 6, 10, e 12 semanas de infecção e a carga parasitária determinada por diluição

limitante. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam PAM3CSK4 via i.p. O número de parasitos na orelha e no linfonodo estão representados como a mediana e DP de cada grupo. Para dados não paramétricos foi utilizado Kruskal-Wallis com pós-teste de *Dunns*. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0,001$ e *** para $P < 0,0001$.

7.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS IFN- γ , IL-10, IL-17 E TGF-B PELAS CÉLULAS DE LINFONODO DRENANTE DE CAMUNDONGOS BALB/C APÓS INFECÇÃO POR *L. BRAZILIENSIS*

Para avaliar o perfil de modulação da reposta imune induzida após a administração de *L. lactis* produtor de Hsp65, foi realizada a quantificação de diferentes citocinas, nos tempos de 2, 6, 10 e 12 semanas após a infecção com *L. braziliensis*. Sendo assim, a resposta imune celular foi determinada a partir de ensaios de ELISA, utilizando sobrenadantes das culturas de células de linfonodos estimuladas com parasitas vivos de *L. braziliensis*. Os resultados mostraram que 2 semanas após a infecção (**Fig. 12**), o grupo HSP+PAM apresentou concentrações significativamente menores de IFN- γ do que grupo controle PAM. Após 10 semanas de infecção (**Fig. 12**), os animais tratados com HSP+PAM continuavam com uma produção de IFN- γ inferior ao grupo PAM. Em relação a IL-10, observou-se que a concentração desta citocina foi maior nos grupos HSP e HSP+PAM comparado aos seus respectivos controles (Vazio e PAM) após 6 semanas (**Fig. 13**), e esse padrão se manteve até 10 semanas após a infecção no grupo HSP (**Fig. 13**). Após 12 semanas de infecção (**Fig. 12 e 13**), a produção IFN- γ e IL-10 diminuiu em todos os grupos, diferente do que foi observado em relação ao TGF- β , onde se observou um aumento em quase todos os grupos, principalmente no que recebeu tratamento com HSP+PAM, porém sem diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais. Com relação à produção de IL-17, verificamos que no tempo de 6 semanas (**Fig. 12**) esta citocina foi produzida em maior quantidade pelos grupos HSP e PAM, e este grupo manteve a produção elevada mesmo após 10 semanas (**Fig. 12**). A maioria das concentrações de citocinas produzidas pelo grupo Lb foram semelhantes às encontradas no grupo Vazio, mostrando assim, que a administração de *L. lactis* Vazio não alterou significativamente o perfil de citocinas produzidas após a infecção. Com relação à IL-4, não foi possível detectar quantidades adequadas, sugerindo que a

produção dessa citocina estaria abaixo do limite de detecção da técnica (dados não mostrados).

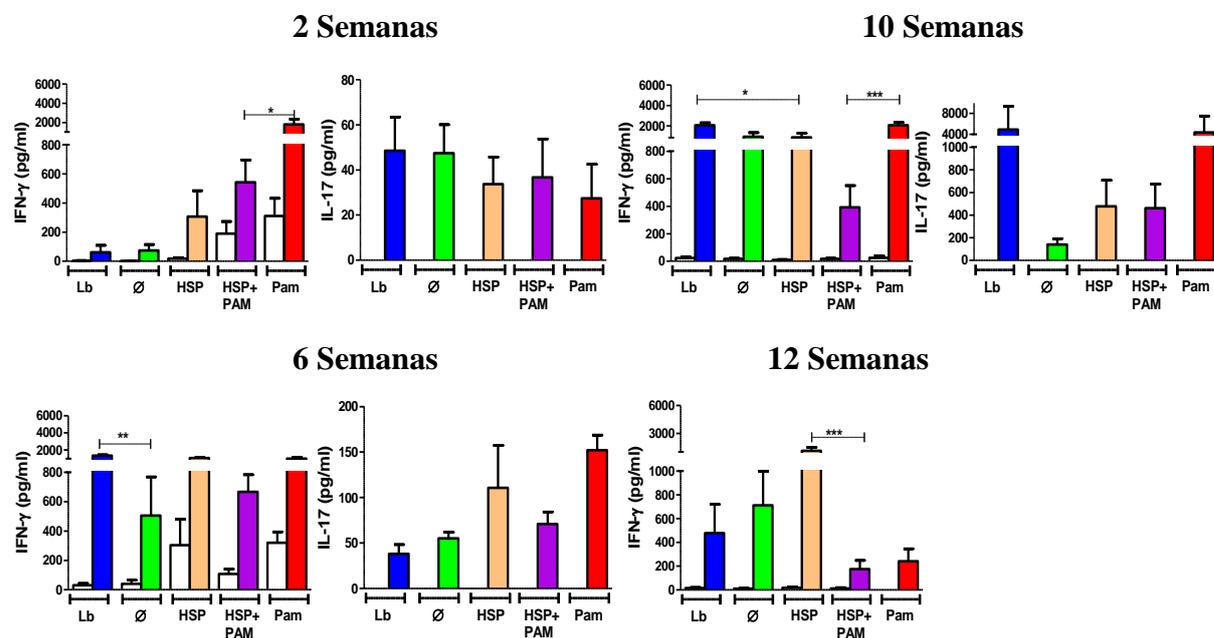


Figura 12. Produção de citocinas inflamatórias por células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* Hsp65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após o pré-tratamento com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária pela via intradérmica. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CSK4 via intraperitoneal 48 horas antes da infecção. Nos tempos de 2, 6, 10 e 12 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados, as células do linfonodo de drenagem da lesão foram cultivadas e reestimuladas in vitro com promastigotas vivas de *L. braziliensis* por 48h. Os sobrenadantes das culturas de células foram então coletados para a dosagem das citocinas. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de HSp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam PAM3CSK4 via i.p. Os dados representam as médias aritméticas \pm DP de cada grupo. As barras brancas representam a produção por células que não receberam o estímulo de *L. braziliensis*. Para dados paramétricos foi utilizado análise de variância One-way (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0,001$ e *** para $P < 0,0001$.

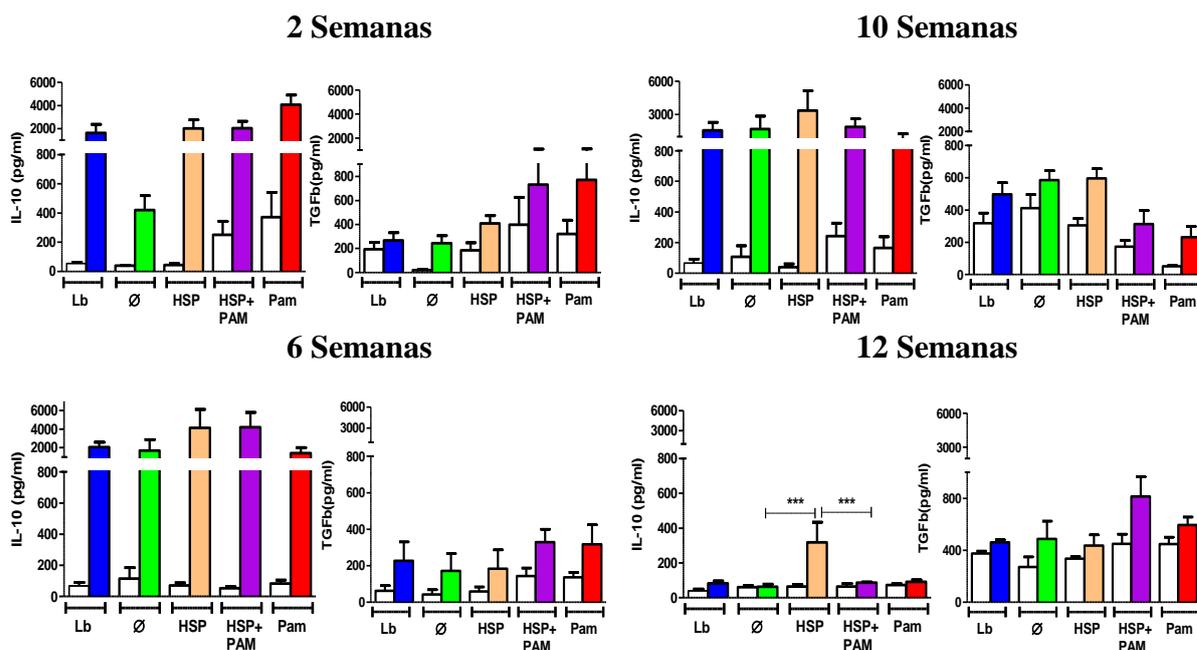
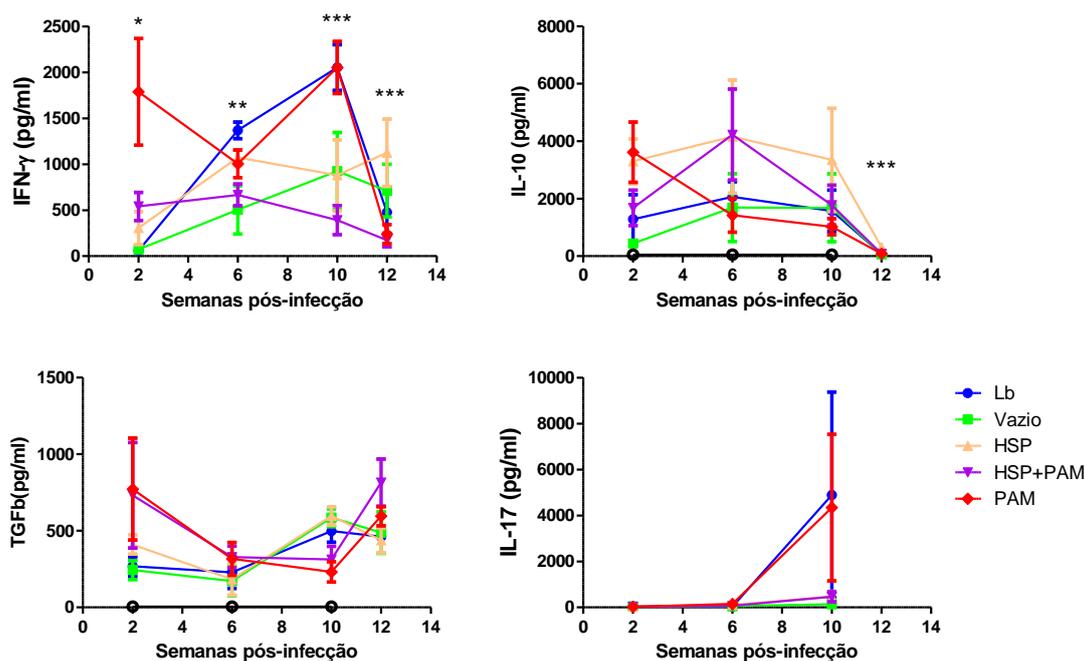


Figura 13. Produção de citocinas reguladoras por células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* HSP65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após o pré-tratamento com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária pela via intradérmica. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CSK4 via intraperitoneal 48 horas antes da infecção. Nos tempos de 2, 6, 10 e 12 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados, as células do linfonodo de drenagem da lesão foram cultivadas e reestimuladas in vitro com promastigotas vivas de *L. braziliensis* por 48h. Os sobrenadantes das culturas de células foram então coletados para a dosagem das citocinas. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam PAM3CSK4 via i.p. Os dados representam as médias aritméticas \pm DP de cada grupo. As barras brancas representam a produção por células que não receberam o estímulo de *L. braziliensis*. Para dados paramétricos foi utilizado análise de variância One-way (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0,001$ e *** para $P < 0,0001$.

Quando analisamos a área sob a curva das citocinas, percebemos que o grupo tratado com HSP+PAM produziu menor quantidade de IFN- γ comparado aos controles (Lb e PAM) (Fig. 14a e b). Além disso, observamos um padrão inverso com relação à produção de IL-10, que foi mais produzida pelo grupo HSP em comparação aos grupos controles (Lb e Vazio), embora sem diferença significativa (Fig. 14a e b). A produção de TGF- β também não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Fig. 14b). Com relação à produção de IL-17, verificamos que os grupos controles Lb e PAM apresentaram concentrações elevadas comparadas aos demais grupos (Fig. 14a e b).

a



b

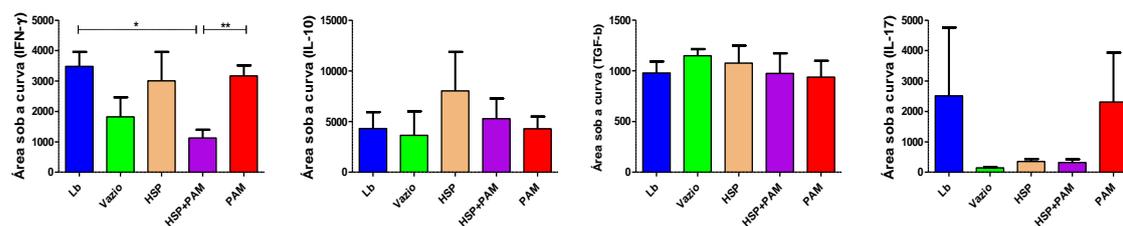


Figura 14. Perfil de citocinas produzidas por células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c re-estimuladas com *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* Hsp65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após o pré-tratamento com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária pela via intradérmica. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CSK4 via intraperitoneal 48 horas antes da infecção. Nos tempos de 2, 6, 10 e 12 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados, as células do linfonodo de drenagem da lesão foram cultivadas e re-estimuladas in vitro com promastigotas vivas de *L. braziliensis* por 48h. Os sobrenadantes das culturas de células foram então coletados para a dosagem das citocinas. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam PAM3CSK4 via i.p. (a): cinética da produção de citocinas após re-estímulo com *L. braziliensis*. (b): A área sob a curva foi construída utilizando dados da produção de citocinas de cada grupo obtidos durante todo o experimento. Para dados paramétricos foi utilizado análise de variância One-way (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0,001$ e *** para $P < 0,0001$.

Também avaliamos a razão entre as citocinas IFN- γ /IL-10, com a finalidade de investigar qual citocina era predominante em cada tempo após a infecção. Embora, não se verifique diferenças estatísticas significantes entre os diferentes grupos, os animais controles, Lb e PAM, apresentam maior produção de IFN- γ em relação a IL-10, duas semanas após a infecção (**Fig. 15**). No decorrer da infecção, nota-se um aumento da relação IFN- γ /IL-10 nos grupos HSP e PAM, exceto, nos animais do grupo HSP+PAM (6 Semanas). Com 10 semanas após infecção, ocorre um aumento significativo da relação IFN- γ /IL-10 no grupo Lb e PAM, mostrando uma resposta extremamente inflamatória nestes animais. No tempo de 12 semanas, todos os grupos apresentaram um aumento na razão destas citocinas, principalmente o grupo Vazio em relação ao grupo HSP.

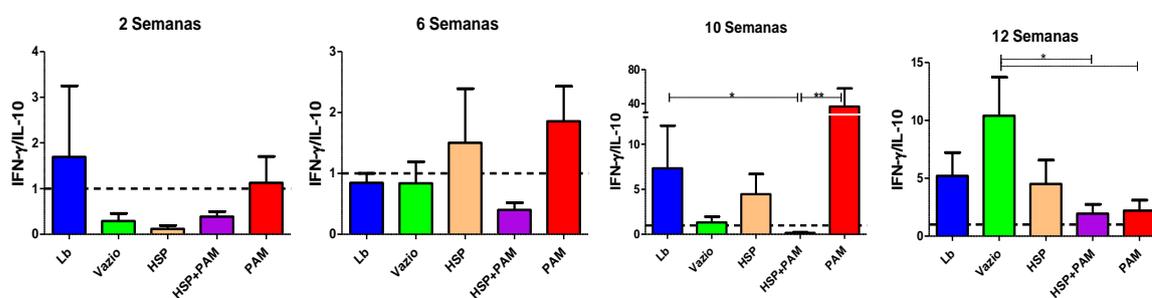
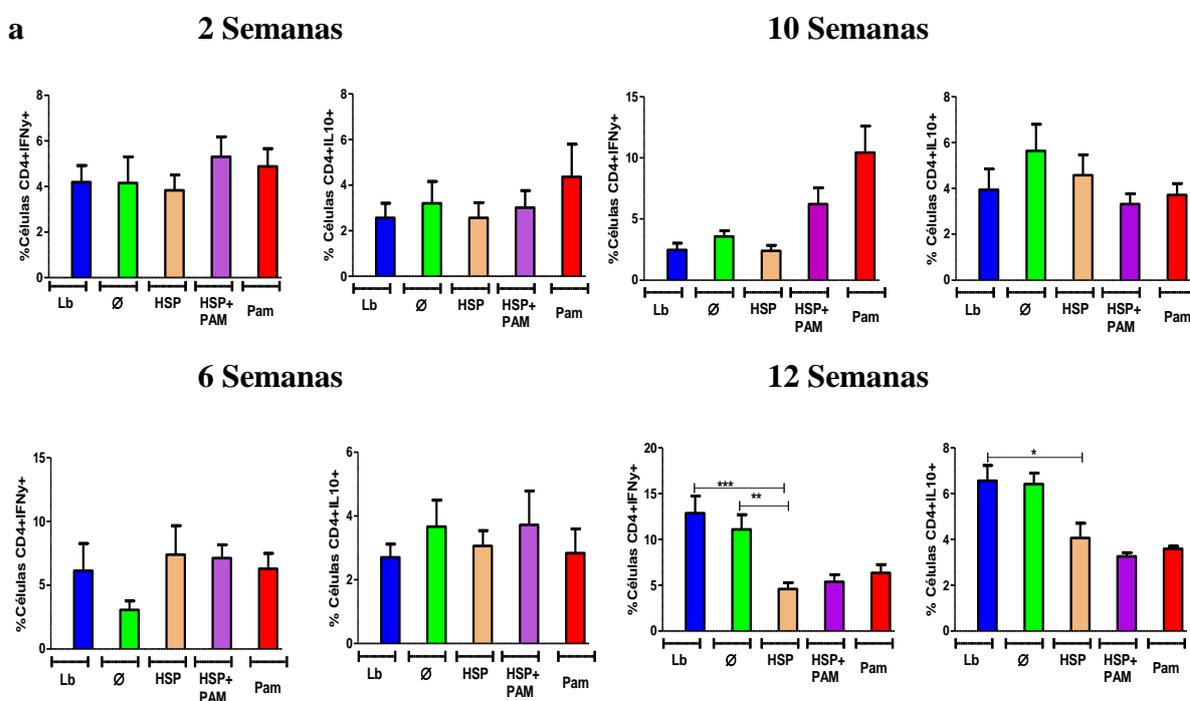


Figura 15. Razão entre a produção de IFN- γ e IL-10 pelas células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c re-estimuladas com *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* Hsp65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após o pré-tratamento com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária pela via intradérmica. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CK4 via intraperitoneal 48 horas antes da infecção. Nos tempos de 2, 6, 10 e 12 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados, as células do linfonodo de drenagem da lesão foram cultivadas e re-estimuladas in vitro com promastigotas vivas de *L. braziliensis* por 48h. Os sobrenadantes das culturas de células foram então coletados para a dosagem das citocinas. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam PAM3CSK4 via i.p. Para dados paramétricos foi utilizado análise de variância One-way (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0,001$ e *** para $P < 0,0001$.

7.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DIFERENTES MARCADORES CELULARES EM CULTURA DE CÉLULAS DE LINFONODO DRENANTE DE CAMUNDONGOS BALB/C APÓS INFECÇÃO

Analisamos também *ex vivo* as células T do linfonodo drenante que expressavam as citocinas IFN- γ e IL-10 intracelularmente. Durante as primeiras semanas de infecção (**Fig. 16a**) não observamos diferenças na frequência de células T CD4⁺ que expressam IFN- γ ou IL-10. Entretanto, após 10 semanas de infecção (**Fig. 16a**), observamos uma maior expressão de IFN- γ pelo grupo controle PAM, corroborando com a intensa inflamação observada nas orelhas dos animais deste grupo. Com 12 semanas de infecção (**Fig. 16a**), o grupo HSP apresentava porcentagens significativamente menores de IFN- γ e IL-10 do que os grupos controles Lb e Vazio. A frequência de células TCD4⁺ produzindo IL-10 não apresentou diferença significativa entre os grupos durante todo o curso da infecção, com exceção dos grupos Lb e Vazio que apresentaram aumento na percentagem destas células após 12 semanas de infecção. A figura **16b** nos permite ter uma noção da porcentagem de células expressando IFN- γ e IL-10 intracelularmente ao longo do experimento.



b

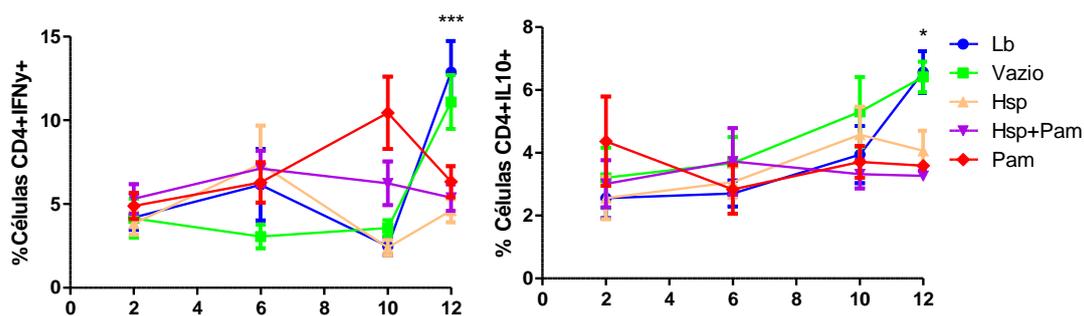


Figura 16 – Expressão de IFN- γ e IL-10 intracelular em cultura de células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c após infecção. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* Hsp65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após o pré-tratamento com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária pela via intradérmica. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CSK4 via intraperitoneal 48 horas antes da infecção. Nos tempos de 2, 6, 10 e 12 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados, as células do linfonodo de drenagem da lesão foram cultivadas e reestimuladas in vitro com promastigotas vivas de *L. braziliensis* por 24h, e em seguida incubadas com Brefeldina por 4h. As células foram isoladas, marcadas e submetidas à técnica de citometria de fluxo. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam PAM3CSK4 via i.p. (a): expressão de IFN- γ e IL-10 intracelular nos tempos de 2, 6, 10, e 12 semanas de infecção. (b): cinética da expressão de IFN- γ e IL-10 intracelular. Os dados representam as médias aritméticas \pm EP de cada grupo. Para dados paramétricos foi utilizado análise de variância One-way (ANOVA), com pós-teste de Tukey. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0,001$ e *** para $P < 0,0001$.

Também investigamos o aparecimento de células T CD4⁺ expressando LAP (TGF- β de membrana) e Foxp3. Com o tempo de 2 semanas pós infecção (**Fig. 17a**) não se registraram diferenças significativas nas frequências destas células. Com 6 e 10 semanas de infecção (**Fig. 17a**), observa-se um aumento na porcentagem de células T CD4⁺Foxp3⁺ no grupo HSP, comparado aos controles Lb e Vazio. Com de 12 semanas de infecção, este mesmo grupo apresenta um aumento na frequência das células T CD4⁺ LAP⁺ comparado aos grupos controles Lb e Vazio. A figura **17b** também nos permite acompanhar a expressão de LAP e Foxp3 ao longo do experimento. Os *Dot plots* representativos das estratégias de análise estão ilustrados na Figura 8 do Material e métodos.

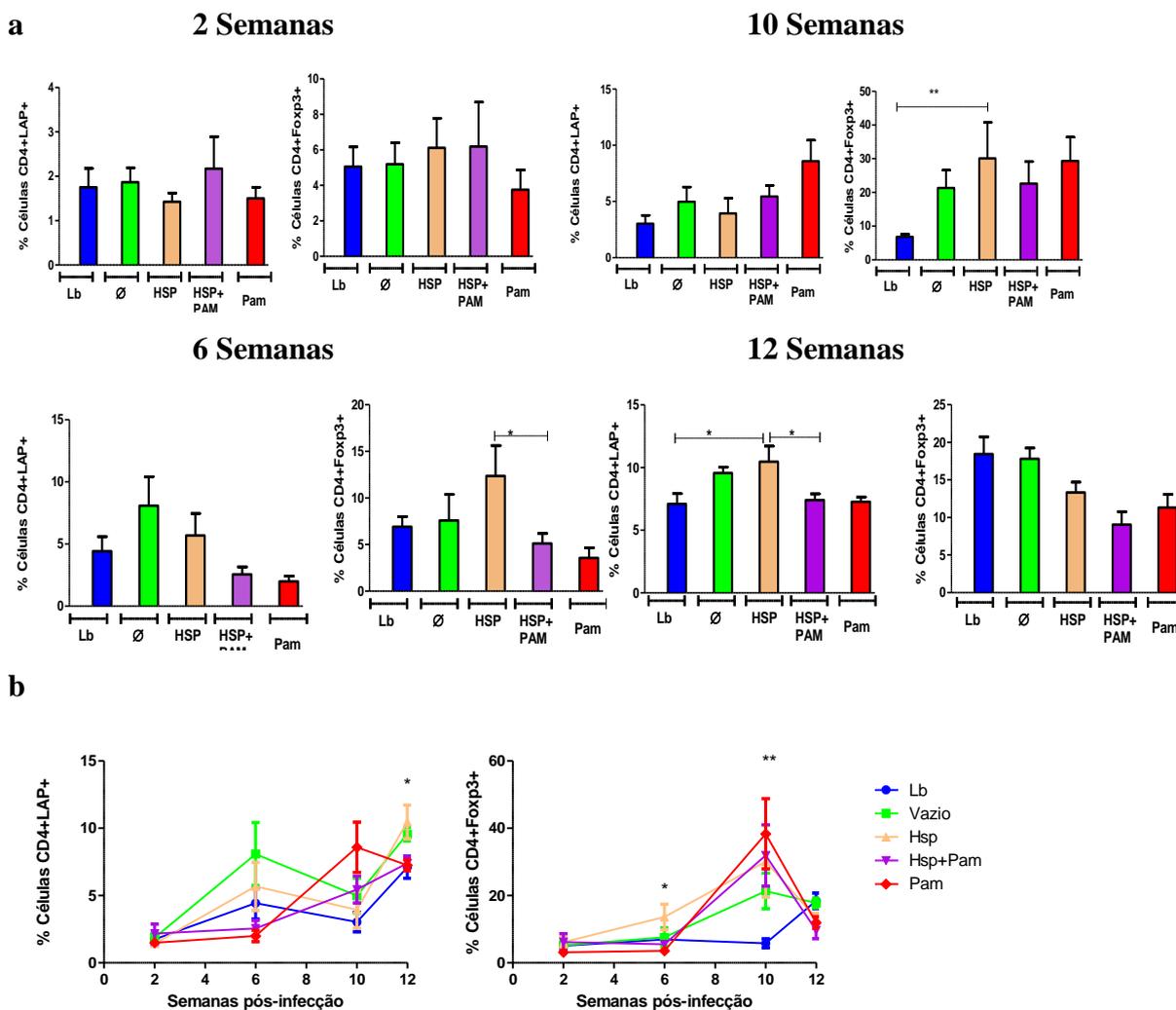
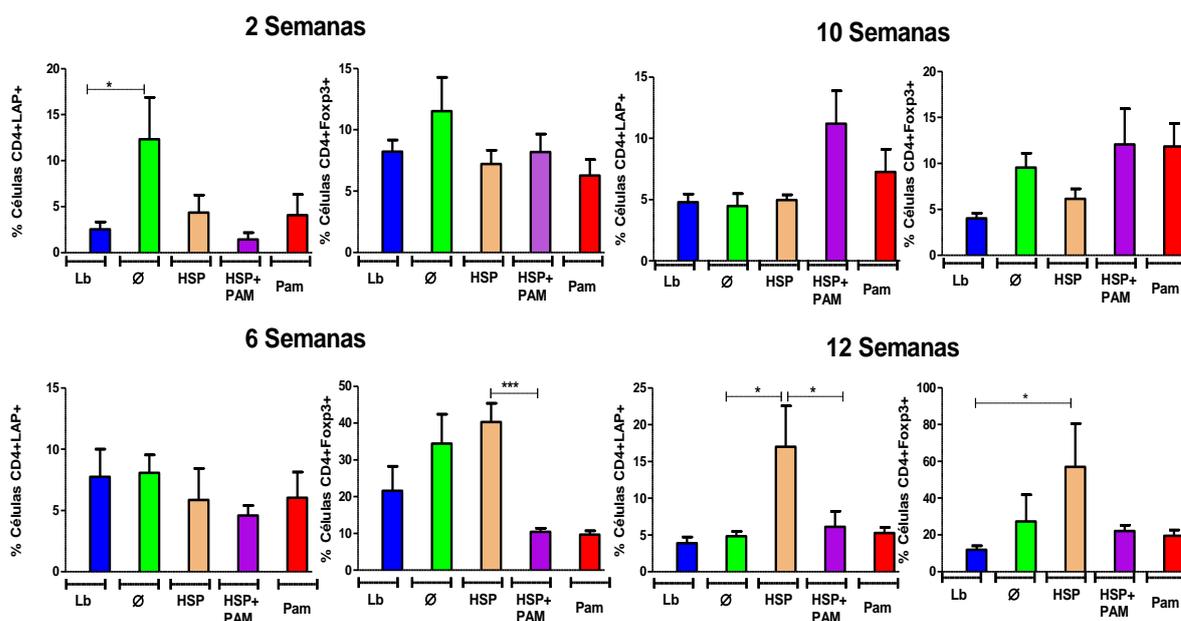


Figura 17 –Expressão de LAP e Foxp3 em cultura de células de linfonodo drenante de camundongos BALB/c após infecção. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* Hsp65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após o pré-tratamento com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária pela via intradérmica. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CSK4 via intraperitoneal 48 horas antes da infecção. Nos tempos de 2, 6, 10 e 12 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados, as células do linfonodo de drenagem da lesão foram cultivadas e reestimuladas in vitro com promastigotas vivas de *L. braziliensis* por 24h. As células foram isoladas, marcadas e submetidas à técnica de citometria de fluxo. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam PAM3CSK4 via i.p. (a): expressão de LAP e Foxp3 nos tempos de 2, 6, 10, e 12 semanas de infecção. (b): cinética da expressão de LAP e Foxp3. Os dados representam as médias aritméticas \pm EP de cada grupo. Para dados paramétricos foi utilizado análise de variância One-way (ANOVA), com pós-teste de Tukey. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0,001$ e *** para $P < 0,0001$.

7.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DIFERENTES MARCADORES CELULARES EM CULTURA DE CÉLULAS DE LINFONODO MESENTÉRICO DE CAMUNDONGOS BALB/C APÓS INFECÇÃO

Avaliamos também o surgimento de células de linfonodo mesentérico expressando LAP e Foxp3. Observamos uma maior porcentagem de células expressando LAP e Foxp3 no grupo Vazio logo no início da infecção (**Fig. 18a**). Observamos também que após 10 e 12 semanas (**Fig. 18c e d**), há maior expressão de células T CD4⁺LAP⁺ nos grupos HSP+PAM e HSP, respectivamente, comparado aos controles Lb, Vazio e PAM. No tempo de 12 semanas após a infecção (**Fig. 18d**), o grupo HSP também apresentou maior número de células expressando Foxp3.

a



b

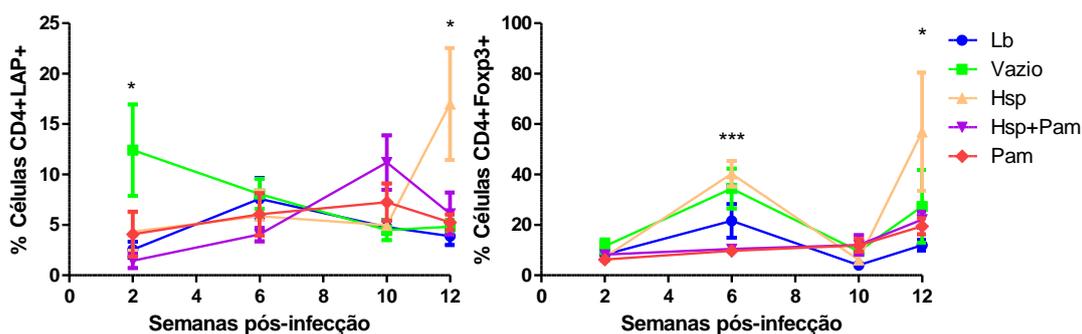


Figura 18– Expressão de LAP e Foxp3 em cultura de células de linfonodo mesentérico de camundongos BALB/c após infecção. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* Hsp65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após o pré-tratamento com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária pela via intradérmica. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CSK4 via intraperitoneal, 48 horas antes da infecção. Nos tempos de 2, 6, 10 e 12 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados, as células do linfonodo mesentérico foram cultivadas e re-estimuladas in vitro com promastigotas vivas de *L. braziliensis* por 24h. As células foram isoladas, marcadas e submetidas à técnica de citometria de fluxo. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam PAM3CSK4 via i.p. **(a)**: expressão de LAP e Foxp3 nos tempos de 2, 6, 10, e 12 semanas de infecção. **(b)**: cinética da expressão de LAP e Foxp3. Para dados paramétricos foi utilizado análise de variância One-way (ANOVA), com pós-teste de Tukey. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0,001$ e *** para $P < 0,0001$.

7.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS IFN- γ , IL-10 E TGF- β PELOS ESPLÊNOCITOS DE CAMUNDONGOS BALB/C APÓS INFECÇÃO POR *L. BRAZILIENSIS*

Também avaliamos o perfil da resposta imunológica produzida pelas células do baço dos camundongos nos sobrenadantes das culturas dos esplenócitos, com e sem o re-estímulo de *L. braziliensis* nos tempos de 2, 6, 10 semanas após a infecção. Os resultados observados mostraram que 2 semanas após a infecção (**Fig. 19**), os grupos HSP+PAM e PAM apresentaram concentrações maiores de IFN- γ do que os demais grupos, mas não significativo. Ao final do experimento (10 semanas), o grupo HSP produziu quantidade menor de IFN- γ quando comparado aos outros grupos, embora sem diferença significativa. Quanto à citocina IL-10, foi observado que após 6 semanas de infecção (**Fig. 20**), os grupos HSP e HSP+PAM apresentaram concentrações mais elevadas do que os grupos controles Lb e Vazio, embora o aumento não tenha sido significativo. Ao final de 10 semanas, a produção de IL-10 não apresentou diferenças significativas entre grupos tratados e controles. Com relação aos níveis de TGF- β , não houve diferença na concentração desta citocina entre os grupos em todos os tempos avaliados.

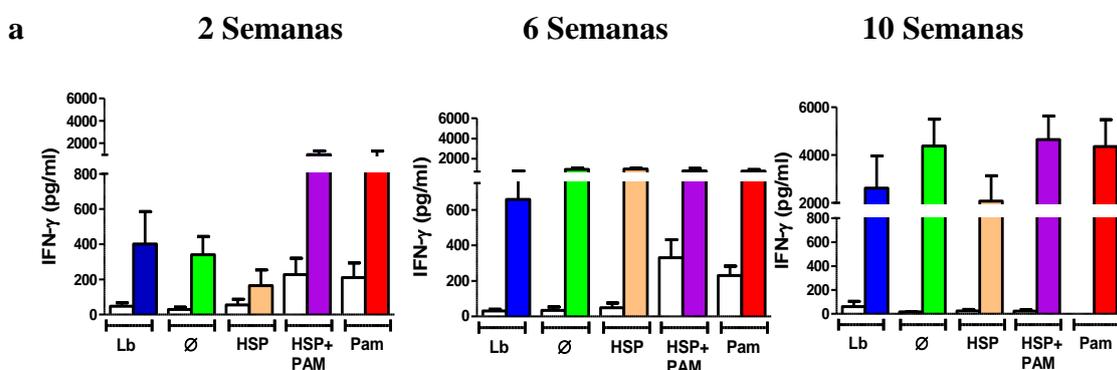


Figura 19. Produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos BALB/c após infecção . Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* Hsp65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após o pré-tratamento com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária pela via intradérmica. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CSK4 via intraperitoneal 48 horas antes da infecção. Nos tempos de 2, 6 e 10 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados, as células do baço foram cultivadas e re-estimuladas in vitro com promastigotas vivas de *L. braziliensis* por 48h. Os sobrenadantes das culturas de células foram então coletados para a dosagem das citocinas. Os dados representam as médias aritméticas \pm EP de cada grupo. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam

PAM3CSK4 via i.p. (a): Os dados representam as médias aritméticas \pm EP de cada grupo. As barras brancas representam a produção por células que não receberam o estímulo da *L. braziliensis*. Para dados paramétricos foi utilizado análise de variância One-way (ANOVA), com pós-teste de Tukey. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0,001$ e *** para $P < 0,0001$.

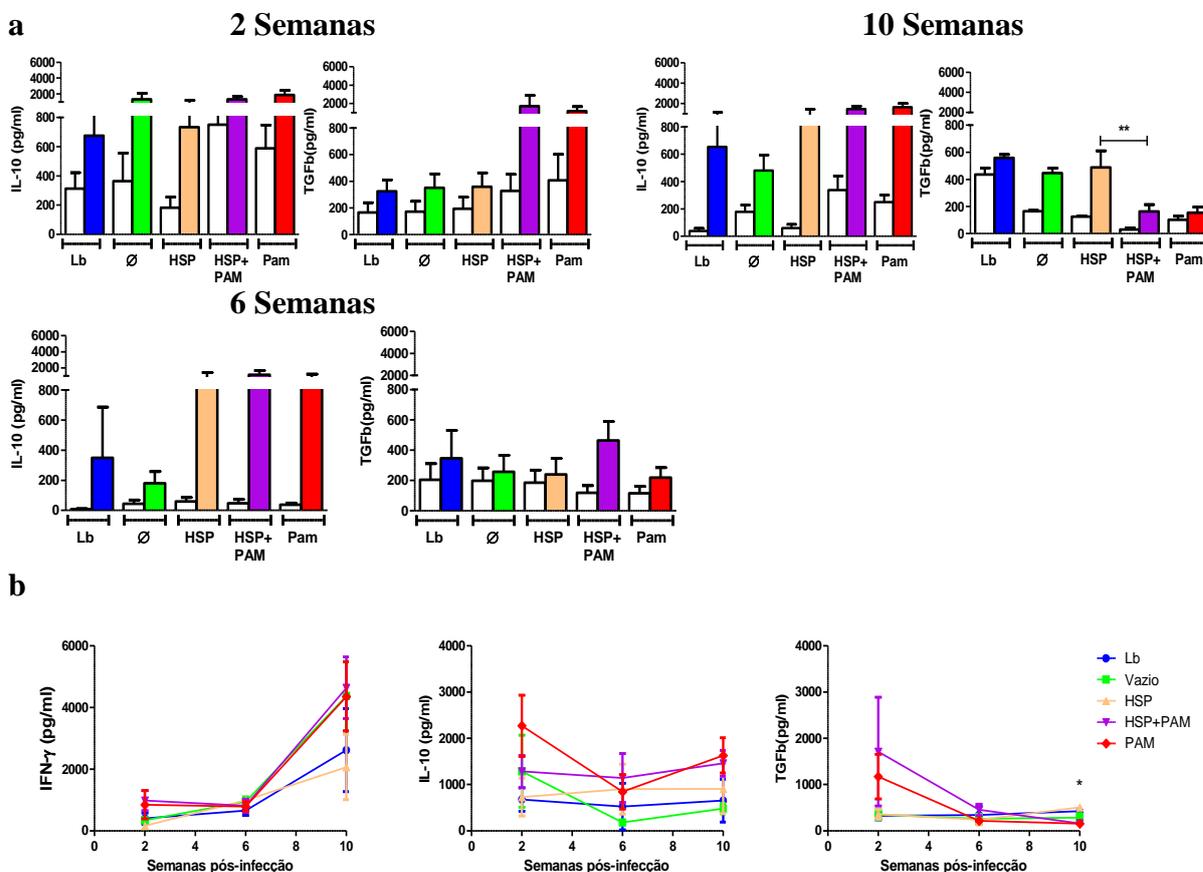
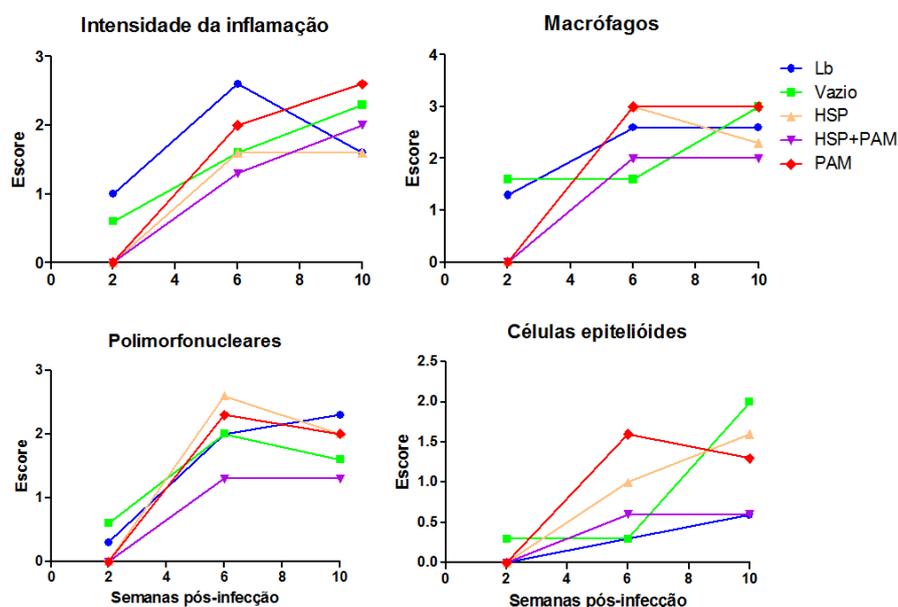


Figura 20. Produção de citocinas reguladoras por esplenócitos de camundongos BALB/c após infecção. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* H65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após o pré-tratamento com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária pela via intradérmica. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CSK4 via intraperitoneal 48 horas antes da infecção. Nos tempos de 2, 6 e 10 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados, as células do baço foram cultivadas e re-estimuladas in vitro com promastigotas vivas de *L. braziliensis* por 48h. Os sobrenadantes das culturas de células foram então coletados para a dosagem das citocinas. Os dados representam as médias aritméticas \pm EP de cada grupo. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que recebem *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que recebem *L. lactis* produtor de Hsp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que recebem *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que recebem PAM3CSK4 via i.p. (a): Os dados representam as médias aritméticas \pm EP de cada grupo. As barras brancas representam a produção por células que não receberam o estímulo de *L. braziliensis*. (b): cinética da produção de citocinas. Para dados paramétricos foi utilizado análise de variância One-way (ANOVA), com pós-teste de Tukey. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0,001$ e *** para $P < 0,0001$.

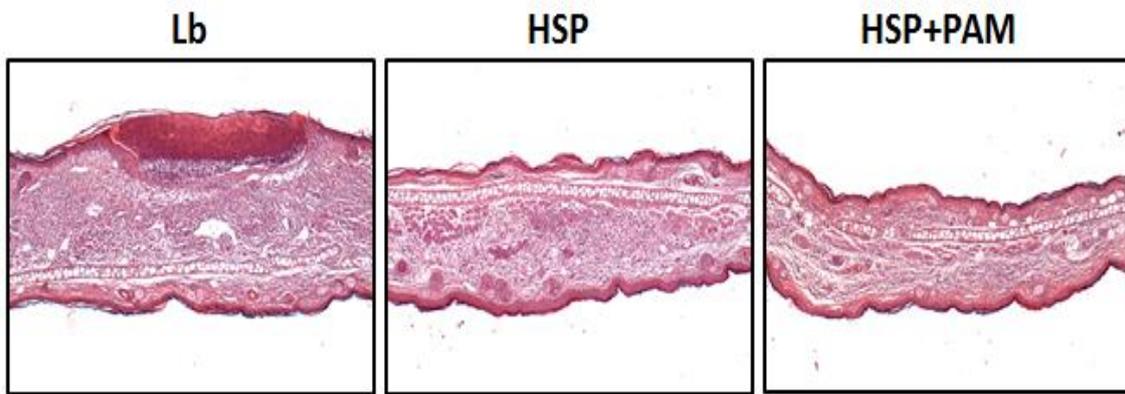
7.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES

Para avaliar a resposta inflamatória nas orelhas infectadas, cortes histológicos das orelhas infectadas e de orelhas saudias (controle negativo) foram analisados. Os principais parâmetros analisados foram: intensidade da inflamação, presença de macrófagos, polimorfonucleares e células epitelióides. A análise histopatológica realizada 2 semanas pós-infecção mostrou uma inflamação muito leve ou ausente em todos os grupos. Apesar de não haver diferença significativa no tamanho das lesões, após 6 semanas de infecção, o grupo Lb apresentou uma maior intensidade da inflamação comparado aos grupos HSP e HSP+PAM, apresentando ulcerações em alguns casos (**Fig. 21a e b**). No tempo de 10 semanas, a intensidade da inflamação nos grupos Vazio e PAM foram as maiores entre grupos (**Fig. 21a**). Com relação à presença de macrófagos, com 6 semanas de infecção estes foram encontrados em maior quantidade no grupo PAM, e em quantidade reduzida no grupo HSP+PAM (**Fig. 17a e c**), e esse padrão foi mantido até o final da infecção. Após 10 semanas de infecção, o grupo Vazio também apresentava um maior recrutamento de macrófagos para o sítio inflamatório. Quanto à presença de células polimorfonucleares, podemos observar que o grupo HSP e HPS+PAM foram os que apresentaram maior e menor número, respectivamente, no tempo de 6 semanas (**Fig. 21a e c**). E nesse mesmo tempo, vimos que as células epitelióides estavam em maior número em lesões do grupo PAM e em menor no grupo HSP+PAM (**Fig. 21a e d**). Dos parâmetros analisados, nenhum apresentou diferença estatística.

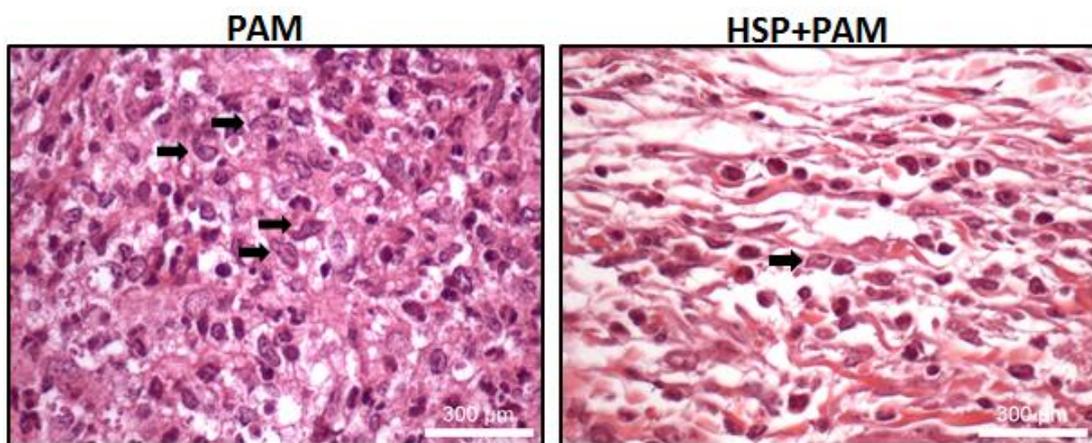
a



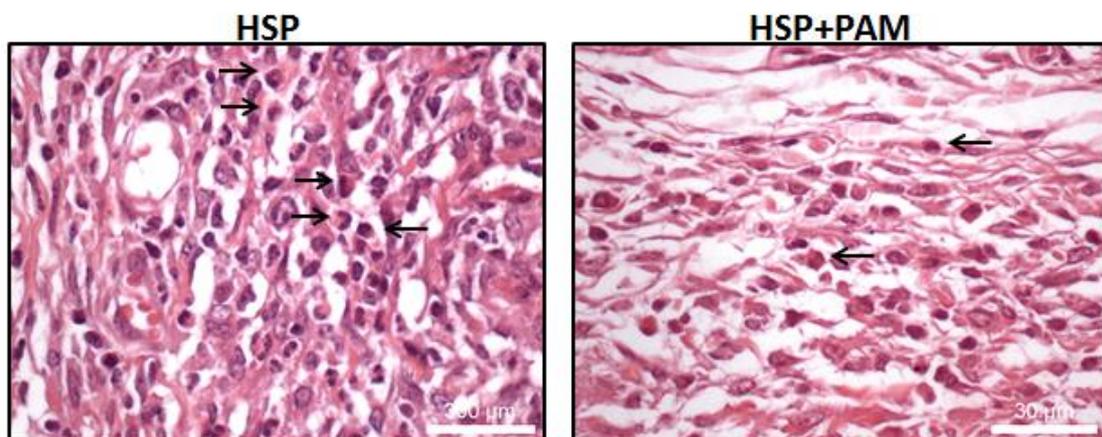
b



c



d



e

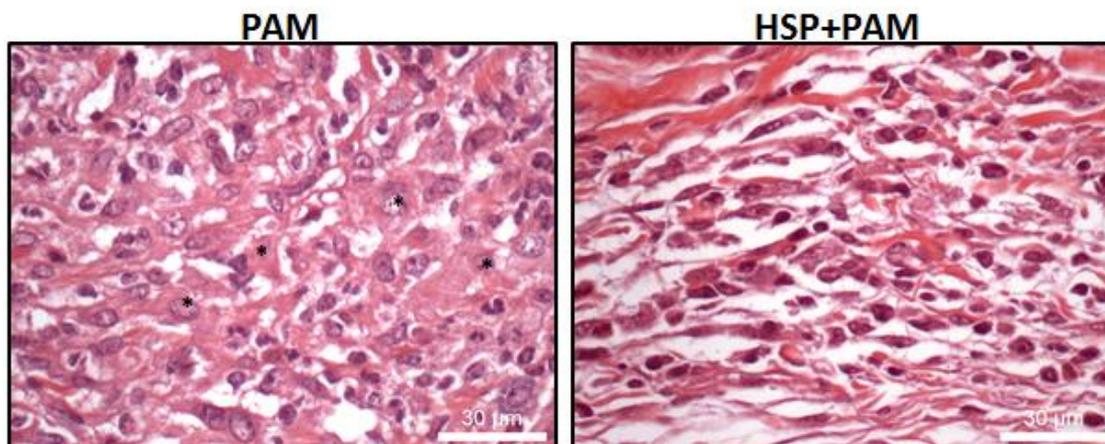


Figura 21 – Análise histológica da lesão de camundongos BALB/c após infecção. Camundongos BALB/c receberam oralmente por 4 dias consecutivos *L. lactis* Hsp65 ou *L. lactis* contendo plasmídeo vazio. A infecção foi realizada na orelha esquerda 10 dias após o pré-tratamento com 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em fase estacionária pela via intradérmica. Os grupos HSP+PAM e PAM receberam PAM3CSK4 via intraperitoneal 48 horas antes da infecção. Nos tempos de 2, 6 e 10 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados, as orelhas foram retiradas e processadas para a confecção de lâminas, que posteriormente foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia ótica. Os seguintes parâmetros foram analisados: intensidade da inflamação, densidade da inflamação, ulceração, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, plasmócitos, mastócitos, células epitelióides, estrutura granulomatóide, agregados macrofágicos e vacúolos parasitóforos. Os parâmetros que tiveram maior relevância foram representados nesta figura. Cada parâmetro foi avaliado segundo presença ou ausência do evento através de escores: 0 (ausência), † (presença de 1-25%), †† (presença de 25-50%) e ††† (>50%). A análise dos parâmetros histopatológicos foi feita levando-se em conta os escores de cada animal. Orelhas de animais sadios foram utilizadas como controle negativo e apresentaram score 0 para todos os parâmetros analisados. Grupos: **Lb**: animais infectados com *L. braziliensis*; **Vazio**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* possuidor do plasmídeo vazio; **HSP**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65; **HSP+PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 e PAM3CSK4 via i.p.; **PAM**: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam PAM3CSK4 via i.p. **(a)**: Os dados representam as médias aritméticas de cada grupo em cada tempo, **(b)**: cortes histológicos representativos dos grupos no tempo de 6 semanas pós-infecção (40x), **(c-e)**: cortes histológicos representativos dos grupos no tempo de 6 semanas pós-infecção (100x). As setas grossas apontam para macrófagos, as setas finas para células polimorfonucleares e asteriscos para células epitelióides. Para dados paramétricos foi utilizado análise de variância One-way (ANOVA), com pós-teste de Tukey.

Tabela 4. Protocolo de avaliação da histopatologia da orelha de camundongos BALB/c após infecção por *L. braziliensis*

Semanas	Sadio	Lb			Vazio			HSP			HSP+PAM			PAM		
	0	2	6	10	2	6	10	2	6	10	2	6	10	2	6	10
Intensidade da inflamação	0	1	2,6	1,6	0,6	1,6	2,3	0	1,6	1,6	0	1,3	2,0	0	2,0	2,6
Densidade da inflamação	0	1	2,6	1,6	0,6	1,6	1,6	0	1,6	1,6	0	1,3	1,6	0	2,0	2,3
Ulceração	0	0	0,3	0	0	0	0,3	0	0,3	0	0	0,3	0,3	0	0,6	0,3
Macrófagos	0	1,3	2,6	2,6	1,6	1,6	3,0	0	3,0	2,3	0	2,0	2,0	0	3,0	3,0
Polimorfonucleares	0	0,3	2,0	2,3	0,6	2,0	1,6	0	2,6	2,0	0	1,3	1,3	0	2,3	2,0
Linfócitos	0	1,0	1,0	0,6	1,0	1,0	1,0	0	0,6	1,3	0	0,6	0,3	0	0,6	1,0
Mastócitos	0	0,6	1,3	1,0	0,3	1,3	0,6	0	1,0	0,6	0	0,6	0	0	1,0	0,3
Plasmócitos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0
Células epitelióides	0	0	0,3	0,6	0,3	0,3	2,0	0	1,0	1,6	0	0,6	0,6	0	1,6	1,3
Estrutura granulomatóide	0	0	0	0	0	0,3	1,0	0	0,6	0,3	0	0,6	0	0	0,3	0,6
Agregados macrofágicos	0	0	0	0,3	0	0,3	2,0	0	1,0	0,6	0	0	0,6	0	1,3	2,0
Vacúolos parasitóforos	0	0	0,6	0,3	0	0	1,0	0	0,3	0,3	0	0	0,3	0	0,3	0,3

Cada parâmetro foi avaliado por um único observador segundo presença ou ausência do evento através de escores: 0 (ausência), † (presença de 1-25%), †† (presença de 25-50%) e ††† (>50%). A análise dos parâmetros histopatológicos foi feita levando-se em conta os escores de cada animal. Orelhas de animais sadios foram utilizadas como controle negativo. Os dados representam as médias aritméticas de 3 animais (9 por grupo).

8. DISCUSSÃO

A leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania braziliensis* é caracterizada por sua cronicidade, latência e tendência a metastatizar no hospedeiro humano (MARSDEN, 1986). Lesões cutâneas únicas ou múltiplas podem ocorrer, sendo mais frequente a úlcera indolor, de borda elevada e fundo necrótico, além do desenvolvimento de uma resposta inflamatória. Neste caso, uma destruição tecidual é resultado de uma resposta imune celular intensa, apesar do restrito número de parasitas presentes no local (BITTENCOURT e BARRAL, 1991). Assim, torna-se extremamente importante investigar possíveis medidas profiláticas ou terapêuticas que possam contribuir na diminuição da inflamação causada pela infecção por *L. braziliensis*.

O processo de indução da tolerância oral é bem sucedido em vários modelos experimentais de doenças autoimunes e outras doenças inflamatórias (GOMES-SANTOS *et al.*, 2017). Antígenos solúveis como proteínas são capazes de induzir tolerância quando administrados oralmente, enquanto antígenos na forma de partículas normalmente induzem reações de hipersensibilidade (MOWAT, 1987). A tolerância induzida por proteínas da dieta é uma forma eficiente de induzir diferentes tipos de células T regulatórias, suprimindo especificamente respostas inflamatórias (FARIA *et al.*, 1998). Ela pode afetar vários aspectos da resposta imune inibindo reações que poderiam causar danos ao hospedeiro, como a reação DTH mediada por célula T e respostas dependentes de imunoglobulina E (IgE) (MOWAT, 1987). Foi demonstrado que os mecanismos envolvidos na tolerância oral podem ser determinados pelo regime de ingestão e dose de antígeno utilizada, enquanto uma dose única e elevada de antígenos de proteína pode causar anergia e/ou deleção de células T específicas, doses baixas e contínuas podem gerar células T regulatórias (WEINER *et al.*, 1994), sendo capaz de suprimir a resposta inflamatória em modelos experimentais de doença autoimune (FARIA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A indução da tolerância oral é um potente meio de estimular o desenvolvimento de células reguladoras antígeno-específica (CASTRO-JUNIOR *et al.*, 2012), e a principal consequência da administração oral de antígenos (FARIA e WEINER, 2006). Embora diversos mecanismos tenham sido propostos para explicar esse fenômeno, a indução de células T regulatórias como CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺LAP⁺, bem como a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF-β, parecem ser peças chave para a indução de tolerância oral (WEINER *et al.*, 2011).

Na maior parte dos estudos é utilizado o mesmo antígeno que desencadeia a inflamação, como é o caso da administração oral da Glicoproteína da mielina de oligodendrócito (MOG) no modelo de encefalomielite experimental e da insulina no modelo de diabetes do tipo 1 (HIGGINS E WEINER, 1988; ZHANG *et al.*, 1991). Porém, foi confirmado que antígenos não relacionados à patologia também podem inibir processos inflamatórios pelo que chamamos de supressão “*bystander*”. Esse método é bastante interessante quando se pretende estudar modelos em que o antígeno alvo ainda é desconhecido ou quando existem múltiplos antígenos que desencadeiam a patologia (FARIA & WEINER, 2006). Essa supressão está associada à tolerância oral por ampliar seu efeito inibitório a outros antígenos, provavelmente pela ação de células T reguladoras produtoras de citocinas não específicas (WEINER *et al.*, 2011; MILLER *et al.*, 1991; FARIA e WEINER, 2011).

Na busca desses antígenos, as proteínas de choque térmico (Hsps) foram escolhidas por serem proteínas facilmente encontradas em todo e qualquer evento inflamatório (HAUET-BROERE *et al.*, 2006; QUINTANA e COHEN, 2010), por sua atividade reguladora do sistema imune, além de serem altamente conservadas entre as espécies, sendo encontradas em organismos desde bactérias a mamíferos. As Hsps são consideradas auto-antígenos imunodominantes por serem facilmente reconhecidas pelo repertório de linfócitos autoimunes em condições fisiológicas (COHEN e YOUNG, 1991). O papel anti-inflamatório das Hsps em doenças inflamatórias e autoimunes já foi demonstrado em diversos modelos como diabetes, artrite, aterosclerose e esclerose múltipla (VAN DEN BROEK *et al.*, 1989; ELIAS *et al.*, 1990; MARON *et al.*, 2002; CHANDAWARKAR *et al.*, 2004). A administração oral de Hsp65 recombinante induz tolerância, capaz de proteger ratos contra artrite adjuvante (COBELENS *et al.*, 2002) e camundongos contra aterosclerose (MARON *et al.*, 2002; HARATS *et al.*, 2002). No entanto, esse foi o primeiro estudo utilizando Hsp65 na atenuação da doença inflamatória causada por um patógeno, como a *Leishmania*.

Nesse trabalho, com o objetivo de desenvolver uma estratégia que induzisse mecanismos tolerogênicos e atenuasse a resposta inflamatória causada pela infecção por *Leishmania braziliensis*, nós utilizamos um protocolo de entrega de uma forma de Hsp65 livre de endotoxina diretamente na mucosa do intestino pelo modo de ingestão contínua (4 dias consecutivos) através de uma cepa de *Lactococcus lactis* recombinante (DE AZEVEDO *et al.*, 2012). Esta bactéria foi escolhida como veículo por não ser patogênica, invasiva e colonizadora, e possuir propriedades probióticas, sendo utilizadas na produção de alimentos

fermentados (CAVANAGH *et al.*, 2015). Uma vantagem desse procedimento é que bactérias geneticamente modificadas podem realizar a liberação da Hsp após sua indução, evitando elevados gastos com a proteína purificada (PONTES *et al.*, 2011). Outros modelos utilizando *Lactococcus lactis* recombinante induzido a secretar outras proteínas heterólogas como IL-10 (STEIDLER *et al.*, 2000), nanocorpo anti-TNF (VANDENBROUCKE *et al.*, 2010) e proteína LcrV (proteína secretada pela bactéria *Yersinia pestis*, que funciona inibindo a inflamação através da interação com receptores do tipo Toll 2) (FOLIGNE *et al.*, 2007), tem sido aplicadas com sucesso em modelos experimentais de colite.

No presente estudo foi observado que a administração prévia à infecção por *Leishmania braziliensis* com *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 derivado do *M. leprae* foi capaz de atenuar o desenvolvimento da lesão e diminuir os sinais de inflamação, preservando o tecido da orelha dos camundongos (grupos HSP e HSP+PAM). Já os animais controles (Lb, Vazio e PAM) apresentaram extensa destruição tecidual com fundo necrótico, resultado de uma intensa atividade da resposta imune celular bem característica no modelo de leishmaniose tegumentar. A ulceração e destruição tecidual na leishmaniose cutânea estão associadas a uma resposta inflamatória intensa no sítio de infecção, devido à elevada concentração de mediadores inflamatórios (RETHI e EIDSMO, 2012). No modelo experimental, camundongos BALB/c tendem a desenvolver lesões cutâneas similares as desenvolvidas por pacientes com leishmaniose cutânea americana, caracterizadas por serem localizadas e ulceradas, com bordas elevadas e fundo necrótico (JONES *et al.*, 1987).

Além disso, os grupos que receberam *L. lactis* Hsp65 apresentaram lesões significativamente menores comparadas aos grupos controles (Lb, Vazio e PAM) a partir da sétima semana de infecção. Utilizamos o PAM3CSK4 em alguns grupos com o objetivo de induzir uma resposta inflamatória mais rápida e intensa, que seria responsável por disparar o efeito anti-inflamatório induzido pela ingestão de Hsp65.

Estudos prévios explorando o uso de lipopeptídeos adjuvantes tem reportado vários tipos de respostas imunes, que variam de uma elevada produção de IL-10 e/ou resposta celular T reguladora (YAMAZAKI *et al.*, 2011; DILLON *et al.*, 2004; 2006) a indução de resposta Th1 (GOWTHAMAN *et al.*, 2011; PANDEY *et al.*, 2014; JAYAKUMAR *et al.*, 2011). Em 2002, Rajan e colaboradores demonstraram que a administração do Pam3CSK4 associada à infecção por *L. major* inativada pelo calor, resultava em lesões de tamanhos significativamente maiores quando comparadas ao grupo controle (PBS) com 4 semanas de infecção (RAJAN *et al.*, 2002). Em nosso modelo, a utilização do PAM revelou-se extremamente inflamatória, porém em associação com a administração de Hsp65, observamos

a criação de um ambiente anti-inflamatório nos linfonodos (drenante e mesentérico) que evitou a destruição tecidual da orelha. Trabalho recente de Gomes-Santos *et al.* mostrou que o pré-tratamento com Hsp65 em modelo de colite leva a uma atenuação da doença, dependente de TLR2 e IL-10. Os autores ainda demonstraram que parece ser uma ligação específica do Hsp65 com TLR2, uma vez que o emprego de outros ligantes de TLR2 não surte o mesmo efeito (GOMES-SANTOS *et al.*, 2017).

Têm sido demonstradas as propriedades anti-inflamatórias das Hsps em vários estudos, tanto em modelos animais de doenças inflamatórias como em humanos (VAN EDEN *et al.*, 2005; DE KLEER *et al.* 2003; PRAKKEN *et al.*, 2004; RRAZ *et al.*, 2001; ALBANI *et al.*, 1995; VAN EDEN e WAKSMAN, 2003). Um dos estudos, por exemplo, mostrou que o pré-tratamento da artrite experimental com Hsp70 atrasou o início da doença e reduziu dramaticamente sua gravidade clínica. Em camundongos deficientes de IL-10 a imunização com Hsp70 não foi capaz de suprimir a doença, demonstrando assim a dependência de IL-10 na regulação imune induzida por essa Hsp (WIETEN *et al.*, 2009). No modelo de encefalomielite experimental, ratos pré-imunizados com peptídeo de Hsp65 também apresentaram redução na gravidade da doença e supressão das respostas inflamatórias, porém os mecanismos envolvidos no efeito não foram elucidados (BIRNBAUM *et al.*, 1996).

Vale ressaltar que, os animais administrados com Hsp65 e posteriormente injetados com PAM (HSP+PAM) no presente trabalho, conseguiram impedir não só o dano tecidual, mas também o aumento da carga parasitária no sítio de infecção e no linfonodo drenante desde o início da infecção. Já o outro grupo que também recebeu Hsp65 (HSP), foi capaz de controlar e reduzir o número de parasitas apenas ao final da infecção, conseguindo ainda assim preservar a arquitetura do tecido da orelha, o que sugere que a administração de Hsp65 pode de alguma forma estar envolvido no controle da inflamação. Porém, um número reduzido de parasitas ainda persistiu nos linfonodos drenantes mesmo após a resolução da lesão.

Nossos dados estão de acordo com os achados da literatura, onde em modelos murinos de infecção por *Leishmania*, a diminuição da espessura da lesão muitas vezes correlaciona-se com a redução da carga parasitária no sítio de inoculação. Alguns trabalhos mostraram que os parasitos podem até ser eliminados após a cura da lesão, mas persistem nos linfonodos de drenagem, sugerindo que mecanismos imunorregulatórios possam permitir a sobrevivência do parasita (COSTA *et al.*, 2011, FALCAO *et al.*, 2012; DE MOURA *et al.*, 2005). Um desses mecanismos pode ser o dependente de IL-10, que contribui para a

persistência do parasita e pode ajudar na manutenção de células T CD4⁺ efectoras de memória que protegem contra uma reinfeção (BELKAID *et al.*, 2002; PETERS *et al.*, 2014).

Apesar da completa resolução das lesões induzidas por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c e C57BL/6, ambos os camundongos falham em eliminar completamente os parasitas do linfonodo drenante da lesão (DE MOURA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007). No modelo de infecção por *L. major*, a persistência do parasita foi associada à presença de fibroblastos que, comparados aos macrófagos, possuem capacidade reduzida de eliminar o parasita intracelular. (CHANG, 1978; DEDET *et al.*, 1983; SCHWARTZMAN e PEARSON, 1985). A participação de células T regulatórias na persistência de *L. major*, assim como no controle da patologia também tem sido descrita (BELKAID *et al.*, 2002; MENDEZ *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 1999; PORROZZI *et al.*, 2004).

Seguindo a infecção experimental por *Leishmania major* em camundongos C57BL/6, o pico da carga parasitária tem sido observado logo antes do desenvolvimento da lesão (BELKAID *et al.*, 2000). Em humanos, a inflamação inicial aguda tem uma fase silenciosa de poucas semanas a meses onde a proliferação do parasita pode seguir sem uma patologia evidente (KUMAR *et al.*, 2009). A fase silenciosa é finalizada por uma intensa inflamação do tecido infectado e formação de uma lesão no sítio de infecção (BELKAID *et al.*, 2000).

Em 1984, Marsden sugeriu que destruição tecidual da LCL é o resultado de uma resposta imune celular intensa, apesar do número restrito de parasitas que está presente no local (MARSDEN, 1984). Estes dados corroboram com nossos achados do grupo PAM, onde os animais apresentaram uma quantidade reduzida de parasitos (tanto no sítio de inoculação quanto no linfonodo drenante) associada a uma elevada inflamação com formação de úlcera observada na orelha.

Acreditamos que os grupos HSP+PAM e HSP podem controlar o dano tecidual por mecanismos como resistência e tolerância. A resistência reduz a carga do patógeno uma vez que a infecção está estabelecida. Ela é uma função do sistema imune, que age detectando, neutralizando e destruindo ou expulsando o patógeno. E tanto o sistema imune inato quanto adaptativo contribuem para a resistência às infecções (SCHMID-HEMPEL, 2011). No nosso estudo, este fenômeno foi principalmente observado no grupo PAM, que não recebeu HSP. Uma boa resposta imune é resultado do balanço entre um nível aceitável de imunopatologia e eliminação do patógeno (CASADEVALL e PIROFSKI, 1999) como observado nos grupos que receberam a Hsp65. O fator requerido para reduzir a carga do patógeno é o mesmo que causa a imunopatologia (AYRES e SCHNEIDER, 2008). A tolerância reduz o impacto

negativo de uma infecção no hospedeiro sem afetar diretamente a carga do parasito (RABERG *et al.*, 2009; READ *et al.*, 2008; SCHNEIDER e AYRES, 2008). É uma estratégia de defesa do hospedeiro que reduz o impacto negativo da destruição tecidual resultante da infecção. Ao contrário dos mecanismos de resistência, a tolerância não afeta diretamente a carga parasitária. Em vez disso, a tolerância diminui os danos causados ao hospedeiro pelos patógenos ou pela resposta imune formada contra ele (MEDZHITOV *et al.*, 2012), corroborando nossos dados encontrados nos grupos que receberam Hsp65.

Em camundongos, o mecanismo de tolerância tem sido bem caracterizado em modelos de infecção por *Plasmodium*, o agente causador da malária. O estágio sanguíneo da infecção está associado à hemólise e a liberação de hemoglobina, que livre promove dano ao tecido (FERREIRA *et al.*, 2008; GOZZELINO *et al.*, 2010). A tolerância à infecção por *Plasmodium* é conferida por mecanismos envolvendo heme-oxigenase, que induzida em resposta ao stress oxidativo, minimiza seus efeitos sem interferir na carga do patógeno (SEIXAS *et al.*, 2009; PAMPLONA *et al.*, 2007).

A tolerância pode ser alcançada pela modificação de vias metabólicas para compensar os efeitos do patógeno, reduzindo o dano causado pelo próprio patógeno ou pela resposta imune contra ele dirigida.

Foi visto que tolerância e resistência são negativamente correlacionadas, o que indica que existe um intercâmbio entre elas (RABERG *et al.*, 2007). Além disso, seus mecanismos parecem ser importantes no controle do desenvolvimento da artrite induzida por *Borrelia burgdorferi* (MA *et al.*, 1998). Ma e colaboradores (1998), mostraram que camundongos BALB/c conseguem reduzir a gravidade da artrite através do controle do número de espiroquetas no tecido, o que indica que essa linhagem utiliza a resistência como mecanismo de controle da infecção. Por outro lado, camundongos C57BL/6N não desenvolvem artrite independente do número de espiroquetas encontradas no tecido, indicando que essa linhagem é capaz de tolerar a patologia da infecção através de mecanismos ainda desconhecidos (MA *et al.*, 1998). Os mecanismos que normalmente mantêm a homeostase de vários sistemas fisiológicos também contribuem para a tolerância do hospedeiro às infecções. (MEDZHITOV *et al.*, 2012).

Já foi demonstrado que a cura em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* é acompanhada por um aumento de IFN- γ . Além disso, animais infectados por essa cepa, quando tratados com anti-IFN- γ , progrediram com a doença e aumentaram significativamente a espessura das lesões, indicando que a resolução das lesões e cura da doença, nestes animais, é dependente de IFN- γ (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998). Outros

estudos também mostraram que as citocinas IL-12 e TNF- α parecem ter papel importante na cura da infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c (ROCHA *et al.*, 2007). Portanto, o seguinte passo deste trabalho foi avaliar o perfil de citocinas induzidas pela administração de *L. lactis* produtor de Hsp65 após a infecção.

De uma forma geral, os animais que receberam Hsp65 (HSP+PAM) apresentaram concentrações mais elevadas de IL-10 e reduzidas de IFN- γ , pelas células do linfonodo drenante da lesão, em relação aos controles (Lb, e PAM) ao longo de toda infecção. Já os animais do grupo HSP, produziram mais IL-10 do que IFN- γ , porém isso pode ter contribuído para a manutenção do tecido da orelha, ausência de resposta inflamatória e controle da carga parasitária observada nesses animais. Já foi visto que a resistência à leishmaniose está relacionada ao desenvolvimento de células T helper 1 (Th1) e produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1, IFN- γ , TNF- α e IL-2, que levam a ativação de macrófagos e consequente morte do parasita (VON STEBUT *et al.*, 2003; NOBENTRAUTH, 2002). Embora a resposta Th1 tenha um papel importante na imunoproteção, a produção excessiva de citocinas inflamatórias pode levar a uma grave imunopatologia (PASPARAKIS, HAASE, NESTLE, 2014; ALLEN, WYNN, 2011; GAUSE, WYNN, ALLEN, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014), como observada nos animais do grupo PAM.

Quanto ao perfil de citocinas no modelo de leishmaniose causada por *L. braziliensis*, também há o desenvolvimento de uma forte resposta imunológica tipo Th1, com produção de principalmente de IFN- γ e IL-17 e expressão de algumas quimiocinas pró-inflamatórias (DE MOURA *et al.*, 2005; VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2008).

A IL-17 é uma citocina considerada altamente inflamatória produzida por células Th17, capaz de mediar a inflamação tecidual e induzir a produção de diferentes citocinas pró-inflamatórias (como IL-6 e TNF- α) e quimiocinas (KOLLS e LINDÉN, 2004). As citocinas IL-1 β e IL-23, assim como TGF- β associado à IL-6, promovem o desenvolvimento de células Th17 (MCGEACHY *et al.*, 2008; MCGEACHY *et al.*, 2007). Diferentes estudos demonstram que a IL-17 está envolvida na imunopatologia da leishmaniose cutânea (GONZALEZ-LOMBANA *et al.*, 2013; LOPEZ KOSTKA *et al.*, 2009). No modelo de infecção por *L. major*, foi mostrado que camundongos C57BL/6 deficientes de IL-10 e infectados apresentavam elevada produção de IL-17, provavelmente responsável pela grave patologia observada e infiltração de neutrófilos no sítio de infecção (GONZALEZ-LOMBANA *et al.*, 2013). Lopes Kostka e colaboradores observaram que a presença de IL-17 promovia a suscetibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major*. Eles encontraram também lesões cutâneas pequenas e com poucos parasitas associada a um número reduzido de neutrófilos no sítio da

lesão de camundongos BALB/c deficientes de IL-17 e infectados com *L. major* (LOPEZ KOSTKA *et al.*, 2009). Na infecção em humanos, Bacellar e colaboradores mostraram que linfócitos de pacientes com leishmaniose mucosa e cutânea produziam uma quantidade elevada de IL-17 em comparação a indivíduos controles não infectados (BACELLAR *et al.*, 2009). Em nossos resultados, observamos no tempo de 6 semanas que o grupo HSP apresenta elevada carga parasitária e um maior recrutamento de células polimorfonucleares para a orelha. Acreditamos que além de TNF- α , a IL-17 possa ter um papel crucial no recrutamento de neutrófilos e conseqüentemente no controle da carga parasitária, já que sua produção foi maior neste grupo. Percebemos também que após 10 semanas de infecção a carga parasitária foi reduzida, provavelmente resultado do infiltrado polimórfico prévio no local.

Em pacientes com leishmaniose cutânea infectados com *L. braziliensis* foi observado uma correlação positiva entre tamanho da lesão e concentrações de IFN- γ e TNF- α , sendo que, pacientes com lesões maiores apresentavam quantidades maiores dessas citocinas apesar da presença de IL-10 no sítio de infecção (ANTONELLI *et al.*, 2004; BACELLAR *et al.*, 2002; ANTONELLI *et al.*, 2005). Em indivíduos subclínicos, a produção moderada de IFN- γ foi associada ao controle do crescimento do parasita e ausência de destruição tecidual (IVONISE *et al.*, 2002). Estes dados corroboram com os nossos encontrados pelos grupos HSP e HSP+PAM, onde podemos associar mais uma vez a produção de citocinas nos linfonodos drenantes aos processos de resistência e tolerância. O perfil de resposta do grupo HSP+PAM, apesar de não ter sido predominantemente Th1, como geralmente ocorre no processo de resistência desse modelo, foi suficiente para controlar a infecção e manter baixa a quantidade de parasitos. Já a tolerância observada no grupo HSP, também foi caracterizada pela constante produção de IL-10, normalmente encontrada elevada em modelos de tolerância, que não afetou a carga parasitária nas 6 primeiras semanas, mas manteve a integridade do tecido da orelha. Embora a produção de citocinas inflamatórias pareça ser requerida para o controle da infecção por *Leishmania*, quando não há o controle da sua produção, pode resultar em uma patologia exacerbada, como observado no grupo PAM.

Nossos resultados também vão de acordo com trabalhos de doenças autoimunes, onde o tratamento de camundongos NOD com peptídeo p277 da Hsp60 (via s.c) diminuiu a patogenicidade da doença através da redução na produção de IFN- γ (ABLAMUNITS *et al.*, 1998). No modelo de aterosclerose, a patogênese da doença assim como o dano endotelial foram atenuados pelos efeitos da elevação de IL-10 e redução de IFN- γ , induzidos pela tolerância oral ao Hsp65 (JING *et al.*, 2011)

Uma citocina que pode inibir a resposta do tipo Th1 é a IL-10, uma vez que esta molécula é capaz de causar a supressão de muitas funções efetoras dos macrófagos (FIORENTINO *et al.*, 1991). Mesmo sendo associadas à persistência do parasita, quando produzida em baixos níveis, as citocinas anti-inflamatórias atenuam reações inflamatórias e aceleram o processo de cicatrização (PASPARAKIS, HAASE, NESTLE, 2014; ALLEN, WYNN, 2011; GAUSE, WYNN, ALLEN, 2013). Acreditamos que nossos resultados estão de acordo com estes trabalhos, e que a IL-10 pode ter sido a responsável pela redução da inflamação observada nos grupos que receberam Hsp65.

A IL-10 suprime a ativação de macrófagos e a maturação de células dendríticas, e sua produção limita a resposta imune contra infecções parasitárias intracelulares como *L. major* e *Toxoplasma gondii* (O'GARRA & VIEIRA, 2007). Foi descrito que a IL-10 age como uma faca de dois gumes na infecção por *Leishmania*, apesar dos efeitos supressores levarem à progressão da doença e persistência do parasita, essa citocina age como um importante imunorregulador na remodelação do tecido durante o processo de cicatrização, minimizando o dano e a patologia causada por uma resposta Th1 exacerbada e suas citocinas inflamatórias, especialmente IFN- γ (GOMES-SILVA *et al.*, 2007; CASTELLANO *et al.*, 2015).

ANTONELLI *et al.* (2004), mostraram uma correlação positiva entre a produção de IL-10 e TNF- α produzidos por monócitos de culturas de PBMC de pacientes com LCL estimulada com antígenos de *Leishmania*, sugerindo que um mecanismo de auto-regulação intrínseco ao macrófago parece estar ativo em pacientes com Leishmaniose cutânea (revisto em OLIVEIRA & BRODSKYN, 2012).

O aumento de IL-10 via Hsp já foi evidenciado em alguns trabalhos com modelos experimentais como, o de Maron e colaboradores em que demonstraram no modelo de aterosclerose que a administração oral de Hsp65 é capaz de aumentar os níveis de IL-10 no local inflamado e assim reduzir a inflamação (MARON *et al.*, 2002). Consistente com a importância do papel da IL-10, Wieten e colaboradores demonstraram que a imunização com Hsp70 de camundongos 10 dias antes da indução de artrite foi capaz de inibir os sinais clínicos e histológicos da doença, via produção de IL-10 (WIETEN *et al.*, 2009). No modelo de colite, a administração de *L. lactis* Hsp65 impediu a redução de IL-10 no tecido do cólon, o que foi crítico para os efeitos imunoregulatórios (GOMES-SANTOS *et al.*, 2017). No modelo experimental de encefalomielite, acredita-se que a administração oral utilizando *L. lactis* Hsp65 previne a patogênese da doença e esse efeito também está associado ao aumento da

produção de IL-10 em cultura de células de linfonodos mesentéricos e baço (REZENDE *et al.*, 2013).

Quanto à concentração de TGF- β observamos que não houve diferenças significativas entre os diferentes grupos de animais, produzido pelas células do linfonodo drenante. Sabe-se que TGF- β é um fator de crescimento com propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras significantes e tem papel central na homeostase do sistema imune e promoção da tolerância (HANSEN *et al.*, 2000). Esta citocina pode suprimir tanto a resposta imune adaptativa e a inata, inibindo a diferenciação de células T em Th1, como também promover a diferenciação de células T CD4⁺CD25⁻ naïve em células Treg induzidas nos órgãos linfóides periféricos e outros tecidos (LAOUAR *et al.*, 2005; LUCAS *et al.*, 2000; NAKAO *et al.*, 2000; GORELIK *et al.*, 2000; SAD e MOSMANN, 1994).

Na infecção por *Leishmania*, TGF- β age inativando macrófagos, inibindo a produção de IFN- γ e óxido nítrico (BARRAL *et al.*, 1995), e desse modo aumentando a susceptibilidade ao parasita (KEDZIERSKI e EVANS, 2014). Barral *et al.* (1995) demonstraram que a adição de TGF- β recombinante a macrófagos murinos ou humanos infectados aumenta a carga parasitária *in vitro* (BARRAL *et al.*, 1995). Outro estudo mostrou que a inoculação local de anticorpos anti-TGF- β em lesões de *Leishmania* leva a uma cicatrização mais rápida da lesão, diminuição da carga parasitária sem alterar a produção de IFN- γ . Desse modo, este estudo sugere que TGF- β pode ter papel regulador importante durante estágios crônicos da Leishmaniose cutânea (LI *et al.*, 1999). Citocinas reguladoras, como IL-10 e TGF- β , podem induzir tanto proteção contra a Leishmaniose como implicar na patogênese da doença. Um balanço na produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias durante a atuação da resposta imune é necessária para controlar a infecção e limitar as reações inflamatórias que levam ao dano tecidual acelerando a cicatrização da lesão característica na Leishmaniose cutânea (MASPI *et al.*, 2016)

Em modelos de doenças autoimunes, o aumento de TGF- β por macrófagos, linfócitos e células mesenquimais está associado ao processo de fibrose e aumento de deposição de colágeno do tipo-1, como evidenciado no modelo de colite (SUZUKI *et al.*, 2011). No estudo realizado por Rezende e colaboradores, acredita-se que TGF- β seja a citocina mais importante liberada por células reguladoras, e um dos mediadores desencadeados pelo tratamento com *L. lactis* produtor de Hsp65 no modelo de encefalomielite (REZENDE *et al.*, 2013). Desse modo, acreditamos que os efeitos observados nos animais que receberam *L. lactis* Hsp65, como atenuação da inflamação e aceleração da cicatrização,

podem ter sido devido a constante produção de IL-10 pelas células do linfonodo drenante destes animais.

Baseado no trabalho de Hoft realizado em 2008, nossos achados de citocinas produzidas pelas células do baço era esperado (Figura 15), já que a imunização dos camundongos foi feita pela mucosa oral. A vacinação na mucosa normalmente gera respostas imunes nos linfonodos e não no baço, já que este órgão é estimulado geralmente após imunizações intramusculares (HOFT, 2008). No caso da infecção por *L. braziliensis*, acreditamos que não foram encontradas alterações significativas no baço por não se tratar de uma infecção visceral, onde não há migração de parasitas para este órgão e consequente ausência de inflamação.

Uma vez que um dos principais mecanismos explicativos pra a indução de tolerância oral é a supressão via células reguladoras (WEINER *et al.*, 2011), nosso próximo passo foi analisar a frequência de células CD4⁺LAP⁺ e CD4⁺Foxp3⁺ induzidas pela administração de *L. lactis* produtor de Hsp65 durante o desenvolvimento da infecção.

Na leishmaniose cutânea, a presença de células Treg está associada a uma resposta imune controlada (SADEGHIAN *et al.*, 2006), enquanto na leishmaniose cutânea disseminada, células Treg Foxp3⁺ foram associadas à persistência do parasita (CARNEIRO *et al.*, 2009). Foi evidenciado no modelo experimental de leishmaniose cutânea, que células Treg Foxp3⁺ encontradas na epiderme podem ter papel chave na limitação da patologia do tecido (KAUTZ-NEU *et al.*, 2011). Por outro lado, na infecção de camundongos C57BL/6 por *L. major*, células Tregs parecem ter um papel na persistência do parasita, suprimindo funções de células T CD4⁺ efectoras através de mecanismos mediados por IL-10 (BELKAID *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, vimos que a administração de *L. lactis* produtor de Hsp65 (grupo HSP) induziu um aumento na frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺ (6 e 10 semanas) e CD4⁺LAP⁺ (12 semanas) tanto em células do linfonodo drenante como do mesentérico comparado aos animais do grupo Vazio (Figura 14 e 15). Células T reguladoras já foram anteriormente descritas por sua importância na manutenção da homeostase intestinal. Recentemente, Gomes-Santos *et al.* demonstraram que o pré-tratamento com Hsp65 foi capaz de prevenir o desenvolvimento da colite em camundongos, induzir células Treg CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺LAP⁺ de modo dependente de TLR2, gerar células dendríticas com perfil tolerogênico, manter a integridade da mucosa intestinal dos animais, induzir o aumento de IL-10 no cólon e reduzir citocinas inflamatórias (GOMES-SANTOS *et al.*, 2017). Em outro modelo

experimental de colite foi visto que linfócitos T CD4⁺LAP⁺, expressando CD25⁺ ou não, parecem participar do controle da inflamação intestinal (GANDHI *et al.*, 2011).

Sabe-se que a mucosa intestinal é um sítio privilegiado para geração de células Tregs expressando LAP na sua superfície (NAKAMURA *et al.*, 2011; OIDA *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2008). Observamos que os animais do grupo HSP+PAM expressaram elevada frequência de células CD4⁺LAP⁺ no linfonodo mesentérico após dez semanas de infecção. Em um trabalho desenvolvido utilizando o modelo de EAE, acredita-se que os elevados números de células Tregs CD4⁺CD25⁺LAP⁺ e CD4⁺CD25⁻LAP⁺ observados nos linfonodos mesentéricos podem ser induzidos ou ativados na mucosa intestinal após a administração do *L. lactis* produtor de Hsp65. Desse sítio, eles podem então migrar para órgãos linfóides secundários (REZENDE *et al.*, 2013).

Vários trabalhos tem evidenciado o papel das Hsps tanto na função como na sobrevivência de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Como efeitos da Hsp60, tem sido demonstrado que, a ligação de TLR2, leva a diminuição da produção de TNF- α e IFN- γ e um aumento de IL-10 pelas células T, além de atuar na manutenção e função de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ via TLR2 (ZANIN-ZHOROV *et al.*, 2006). Corroborando com isso, têm sido reportados inúmeros efeitos anti-inflamatórios da Hsps associados à presença de células Tregs em modelos de doenças autoimunes como artrite reumatóide (WIETEN *et al.*, 2009), diabetes tipo 1 (ABLAMUNITS *et al.*, 1999) esclerose múltipla (ZORNELLA-PEZAVENTO *et al.*, 2010) e aterosclerose (MARON *et al.*, 2002). Foi observado no modelo de encefalomielite experimental um aumento no número de células T reg Foxp3⁺ assim como de células CD4⁺LAP⁺ em animais pré-tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65. Eles então associaram a melhora da doença como um efeito mediado principalmente por células Treg LAP⁺, assim como ao aumento da produção de IL-10 pelas de células do linfonodo mesentérico e do baço (REZENDE *et al.*, 2013). O aumento de células regulatórias expressando Foxp3 também foi observado em camundongos que receberam Hsp65 no modelo de aterosclerose (VAN PUIJVELDE *et al.*, 2007).

Por outro lado, foi visto que a imunização com Hsp70 pode induzir a diferenciação de células T produtoras de IL-10, sem aumentar a expressão de Foxp3. Além de células T CD25⁺ expressarem Foxp3, um subgrupo de células T regulatórias, como as Tr1, que não expressam elevados níveis de Foxp3 podem estar envolvidas (RONCAROLO *et al.*, 2006). Células Tr1 são induzidas na periferia e após serem apresentadas a um antígeno, expressam elevadas quantidades de IL-10 (RONCAROLO e GREGORI, 2008). Estes trabalhos indicam a possível presença de diferentes tipos de regulação em diferentes modelos

de inflamação. (WIETEN *et al.*, 2009). A tolerância periférica induzida por via oral é uma forma eficiente de suprimir respostas inflamatórias pela indução de diferentes tipos de células T regulatórias. (FARIA e WIENER, 2006).

Posteriormente, avaliamos a histopatologia das orelhas infectadas, e observamos que, após 6 e 10 semanas de infecção, os animais administrados com *L. lactis* produtor de Hsp65 (HSP e HSP+PAM) apresentaram uma redução na intensidade da inflamação comparado aos controles. Apesar de o grupo HSP ter recrutado mais neutrófilos e macrófagos (6 semanas), isso parece ter favorecido o controle parasita na orelha e não a inflamação.

Na leishmaniose experimental, o infiltrado dérmico agudo consiste de neutrófilos e macrófagos. O recrutamento de neutrófilos associado à produção de IFN- γ pelos macrófagos restringe a replicação de parasita (VENUPRASAD *et al.*, 2003; BELKAID *et al.*, 2001). Isto pode explicar a redução da carga parasitária após o infiltrado precoce de neutrófilos observado nas orelhas do grupo HSP. A ulceração da pele está associada a uma resposta inflamatória local exacerbada, a qual usualmente ocorre poucas semanas após o desenvolvimento da lesão. A participação dos neutrófilos na lesão de leishmaniose cutânea tem sido reportada, no modelo de pata e orelha, em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Esses animais desenvolvem uma inflamação local consistindo de macrófagos epitelióides e células polimorfonucleares (DONNELLY *et al.*, 1998; INDIANI DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; DE MOURA *et al.*, 2005), as quais também são recrutadas na infecção intradérmica da orelha (ANDRADE *et al.*, 1984; LIMA *et al.*, 1998). Durante a infecção, a redução dos neutrófilos coincide com o aumento na carga parasitária, já em camundongos co-inoculados com parasitas e neutrófilos a carga parasitária no sítio de infecção e nos linfonodos drenantes é reduzida (NOVAIS *et al.*, 2009). Desse modo, como dito anteriormente, é possível que o elevado número de neutrófilos encontrados na orelha de animais do grupo HSP após 6 semanas de infecção seja resultado do aumento na produção de IL-17, e este fato seja responsável pela redução da carga parasitária após esse período.

A preservação tecidual induzida pelo tratamento com Hsps foi evidenciada em diversos modelos de doenças autoimunes. A administração de peptídeos da Hsp60 inibiu significativamente o escore clínico e o tamanho da pata, assim como o infiltrado inflamatório e a hiperplasia sinovial no modelo de artrite (SHI *et al.*, 2014). Neste mesmo modelo, foi mostrado que o pré-tratamento com Hsp70 atrasou o início da doença e reduziu drasticamente a gravidade da doença, tanto clinicamente como histologicamente (WIETEN *et al.*, 2009). O uso oral de Hsp65 mostrou-se capaz de diminuir o dano endotelial da aorta caracterizado pela patogênese da aterosclerose (JING *et al.*, 2011), assim como abolir os sinais de inflamação na

mucosa da animais com colite, bem como seu índice macroscópico, preservando sua arquitetura e resultando apenas em um discreto infiltrado inflamatório (GOMES-SANTOS *et al.*, 2017).

Como vimos, o uso de *L. lactis* Vazio não afetou positivamente o desenvolvimento da doença. Com isso, atribuímos que os efeitos regulatórios observados após a administração oral de *L. lactis* produtor de Hsp65 foi dependente do Hsp65 derivado do *M. leprae*. Acreditamos que por essas proteínas serem consideradas auto-antígenos e naturalmente toleradas pelo sistema imune, a presença do *L. lactis* em um ambiente tolerogênico como o intestino, pode atuar como um sinal para o sistema imune, facilitando o reconhecimento da Hsp65 e sua ação imunomodulatória.

Resumidamente, nossos resultados fornecem até o momento novos conhecimentos sobre o mecanismo por trás dos efeitos imunomodulatórios do Hsp65 em um protocolo de alimentação contínua.

9 CONCLUSÃO

No presente estudo, demonstramos que a administração por via oral de *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 minimizou o dano tecidual da orelha causada pela infecção pela *Leishmania braziliensis*. Além disso, tal tratamento diminuiu o tamanho da lesão e conteve a carga parasitária no sítio de infecção e no linfonodo drenante. O seu uso também induziu o aumento da IL-10 (grupo HSP) e diminuição de IFN- γ (grupos HSP e HSP+PAM), principalmente em células de linfonodos drenante do grupo HSP+PAM. Houve aumento da frequência de células T regulatórias, como CD4⁺LAP⁺ e CD4⁺Foxp3⁺ nos linfonodos drenantes e mesentéricos de animais do grupo HSP.

De acordo com os nossos dados, concluimos que a administração oral do *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 derivado de *Mycobacterium leprae* foi capaz de atenuar os efeitos da inflamação causada pela infecção por *Leishmania braziliensis*.

Além disso, a associação entre o *L. lactis* e Hsp65 derivado do *Mycobacterium leprae* pode ser visto como um candidato na profilaxia, não só para doenças autoimunes, como para doenças inflamatórias crônicas causadas por patógenos.

REFERÊNCIAS

- ABLAMUNITS, V.; ELIAS, D.; COHEN, I. R. The pathogenicity of islet-infiltrating lymphocytes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 115, n. 2, p. 260–267, 1999.
- ABLAMUNITS, V. et al. T cells secreting IFN-gamma in NOD mouse diabetes: arrest by p277 peptide treatment. **J. Autoimmun.**, v.11, n.1, p.73-81, 1998.
- AGA, E. et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 169, p. 898-905, 2002.
- ALBANI, S. et al. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. **Nat. Med.**, v. 1, p. 448–452, 1995b.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J. Cell Sci.**, v.18, p. 2993-3002, 1999.
- ALLEN, J. E.; WYNN, T. A. Evolution of Th2 Immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens. **PLoS Pathogens**, v.7, n. 5, p.e1002003, 2011.
- ANDRADE, Z.A. et al. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, v.114, n.1, p.137-144, 1984.
- ANNUNZIATO, F. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. **J. Exp. Med.**, v. 204, n.8, p.1849–1861, 2007.
- ANTONELLI, L. R. V. et al. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clin. Exp. Immunol.**, v.136, n. 2, p. 341–348, 2004
- ANTONELLI, L.R. et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, v.101, p. 226–230, 2005.
- ANTONIE, J. C. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbor *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiol.**, v.6, p.392-401, 1998.
- AWASTHI, A. et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. **Nat Immunol.** v. 8, n. 12, p. 380–389, 2007.
- AYRES, J. S.; SCHNEIDER, D. S. A signaling protease required for melanization in *Drosophila* affects resistance and tolerance of infections. **PLoS Biol.**, v. 6, n. 12, p 2764-2773, 2008.
- AZEVEDO, M. S. P. D. **Avaliação da imunogenicidade de linhagens de *Lactococcus lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de *Mycobacterium leprae***. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. 138 p.

BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous Leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 200, n. 1, p.75–78, 2009.

BACELLAR, O. et al. Up-Regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.

BALDWIN, T. et al. Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection. **Parasite Immunol.**, v. 29, n. 10, p.501-513, 2007.

BARRAL, A. et al. Transforming growth factor- β in human cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, v. 147, p. 947–954, 1995.

BECKER, I. et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.130, n. 2, p. 65–74, 2003.

BELKAID, Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 3, p. 875–885, 2003.

BELKAID, Y. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v.420, p.502–507. 2002.

BELKAID, Y. et al. The role of interleukin IL-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J. Exp. Med.**, v.194, p.1497-1506, 2001.

BELKAID, Y. et al. Development of natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **J. Exp Med.**, v. 188, Nov 16; n.10, p. 1941-1953, 1998.

BELKAID, Y. et al. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J. Immunol.**, v.165, n. 2, p. 969-977, 2000.

BELKAID, Y.; NAIK, S. Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. **Nat. Immunol.**, v.14, n. 7, p.646-653, 2013.

BELKAID, Y. et al. CD8 T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 168, p. 3992–4000, 2002.

BINDER, R. J.; et al . The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. **Tissue Antigens.**, v.64, n.4, p.442-451, 2004

BIRNBAUM, G. et al. Heat shock proteins and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): I. Immunization with a peptide of the myelin protein 2',3' cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase that is cross-reactive with a heat shock protein alters the course of EAE. **J. Neurosci. Res.**, v. 44, n. 4, p. 381-396, 1996.

- BITTAR, R.C. et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, p. 625–630, 2007.
- BITTENCOURT, A. L.; BARRAL. A. Evaluation of histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.86, p.51-56. 1991.
- BOLOTIN, A. et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403. **Genome Res.**, v.11, p. 731-753, 2001.
- BORGES, J. C.; RAMOS; C. H. Protein folding assisted by chaperones. **Protein Pept. Lett.**, v.12, n.3, p.257-261, 2005.
- BOURREAU, E. et al. High intralésional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 1628–1630, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** - 2. ed. atual. Brasília : Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>> Acesso em: 12 agosto 2017.
- BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nat. Rev. Immunol.** , v. 5, p. 641–654, 2005.
- CARNEIRO, F.P. et al. Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. **Parasite Immunol.** , v. 31, n. 10, p. 646-651, 2009.
- CARR, F.J., CHILL, D. AND MAIDA N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 28, p. 281-370, 2002.
- CARVALHO, E. M. Immunology in Brazil. **Ciê. Cultra**, v.46, n.5/6, 1994.
- CARVALHO, E.M. et al. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.53, p. 273-277, 1995.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infect Immun.** , v. 67, n. 8, p. 3703-3713, 1999.
- CASTELLANO, LR. et al. Potential Use of Interleukin-10 Blockade as a Therapeutic Strategy in Human Cutaneous Leishmaniasis. **J. Immunol. Res.** , v. 2015, p.152741, 2015.
- CASTELLANO, L.R. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Hum. Immunol.**, v. 70, p.383–390, 2009.

CASTRO-JUNIOR, A.B. et al. Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. **Cell Immunol.** ,v. 280, n. 2, p. 171–181, 2012.

CAVANAGH, D.; FITZGERALD, G.F.; MCAULIFFE, O. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food Microbiol.**, v. 47, p. 45–61, 2015.

CHANDAWARKAR, R. Y.; et al. Immune modulation with high-dose heat-shock protein gp96: therapy of murine autoimmune diabetes and encephalomyelitis. **Int. Immunol.**, v.16, n.4, p.615-624, 2004.

CHANG, K. P. *Leishmania* infection of human skin fibroblasts in vitro: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes, and their intracellular transformation. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 27, n. 6, p. 1084-1096, 1978.

CHEN, M.L. et al. Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.** , v.180, p. 7327–7337, 2008.

CHEN, Y. et al. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. **Nature** , v. 376, p.177–180, 1995.

CHERVONSKY, A. V. Intestinal commensals: influence on immune system and tolerance to pathogens. **Curr. Opin. Immunol.**, v.24, n. 3, p.255-260, 2012.

CHILDS, G. E. et al. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana* and *L. aethiopica*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.78, p.25-34, 1984.

CHUN, J.N. et al. Cytosolic Hsp60 is involved in the NF-kappaB-dependent survival of cancer cells via IKK regulation. **PLoS One**, v. 5:, p.e9422, 2010.

COBELENS, P.M. et al. Dynamics of mycobacterial HSP65-induced T-cell cytokine expression during oral tolerance induction in adjuvant arthritis. **Rheumatology (Oxford)** , v. 41, p.775-779, 2002.

COHEN, I. R.; YOUNG, D. B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. **Immunol. Today**, v.12, n.4, Apr, p.105-110,1991.

CONVIT, J. et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.87, n.4, p.444-448, 1993.

COSTA, D. L. et al. BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v.5, p.e965, 2011.

COSTA, J. M. L. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.89, p.319-323, 1986.

- COSTA, J. M. et al. Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia braziliensis* in cutaneous lesions. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.23, n.4, p.205-208, 1990.
- D' OLIVEIRA, A. JR.; MACHADO, P. R.; CARVALHO, E.M. Evaluating the efficacy of allopurinol for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Derm.** 36: 938-946, 1997.
- DE AZEVEDO, M.S. et al. Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. **Genet. Mol. Res.**, v. 11, n. 2, p. 1146–1157, 2012.
- DE KLEER, I. M, et al . CD4⁺CD25⁺ bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. **J. Immunol.**, v. 172, p. 6435-6443, 2004.
- DE KLEER, I. M. et al. The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30⁺ T cells directed to human heat-shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10. **Arthritis Rheum.**, v.48, n. 7, p.2001-2010, 2003.
- DE LUCA, P. M.; MACEDO, A. B. B. Cutaneous Leishmaniasis vaccination: a matter of quality. **Front. Immunol.**, v. 21, n. 7, p.151, 2016.
- DE MOURA, T.R. et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 5827-5834, 2005.
- DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKY, C.I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Front. Immunol.** v.3, p.145, 2012.
- DE VRESE, M. et al. Probiotics compensation for lactase insufficiency. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.73, p. 421S-429S, 2001.
- DEDET, J.P. et al. Uptake and killing of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes by human skin fibroblasts. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** , v. 77, n. 1, p.35-44, 1983.
- DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect. Imm.**, v. 66, n. 2, p. 827–829, 1998.
- DILLON, S. et al. A Toll-Like Receptor 2 Ligand Stimulates Th2 Responses In Vivo, via Induction of Extracellular Signal-Regulated Kinase Mitogen Activated Protein Kinase and c-Fos in Dendritic Cells. **J. Immunol.**, v.172, n. 8, p.4733–4743, 2004.
- DILLON, S. et al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 4, p.916–928,2006.
- DONNELLY, K.B.; LIMA, H.C.; TITUS, R. G. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. **J. Parasitol.** , v. 84, n. 1, p.97-103, 1998.

DUTHIE, M.S. et al . Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. **Immunol. Rev.**, v. 239, n. 1, p.78–96, 2011.

ELIAS, D. et al. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the nonobese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.87, n.4, Feb, p.1576-1580, 1990.

ELLIS, R. J. The molecular chaperone concept. **Semin. Cell. Biol.**, v.1, n.1, p.1-9, 1990.

FALCÃO, S. C. et al. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. **Int. J. Parasitol.**, v.42, n.8, p.771-780, 2012.

FARIA, A.M. et al. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. **Mech. Ageing Dev.**, v. 102, n. 1, p. 67–80, 1998.

FARIA, A.M.; WEINER, H.L. Oral tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 206, p.232–259, 2005.

FARIA , A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 13, n. 2–4, p.143–157, 2006.

FARIA, A. M., et al . Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Autoimmun**, v.20, n.2, p.135-145, 2003.

FERREIRA, A. et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **J. Mol. Med.**, v. 86, n. 10, p.1097-1111, 2008.

FIorentino, D. F. et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, v.146, n.10, p.3444-3451, 1991.

FOLIGNE, B. et al. Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. **Gastroenterology**, v. 133, n. 3, p.862–874,2007.

FRIEDMAN, A.; WEINER, H. L. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p. 6688–6692, 1994.

GANDHI, R. et al . Cutting edge: human latency-associated peptide+ T cells: a novel regulatory T cell subset. **J. Immunol.**, v.184, n.9, p.4620-4624, 2011.

GAUSE, W. C.; WYNN, T.A.; ALLEN, J.E. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, n. 8, p. 607–614, 2013.

GAZE, S.T. et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. **Scand. J. Immunol.**, v.63, p. 70–78, 2006.

GOMES-SANTOS, A.C. et al. Hsp65 Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. **Front. Immunol.**, v. 30, p. 8-30, 2017.

- GOMES-SILVA, A. et al. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **Parasitology**, v.140, n.6, p. 771–779, 2013.
- GOMES-SILVA, A. et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clin. Exp. Immunol.**, v.149, n. 3, p.440-444, 2007.
- GONZALEZ-LOMBANA, C. et al. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. **PLoS Pathog.**, v.9, n. 3, p. e1003243, 2013.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.**, v.3, p.23–35, 2003.
- FIELDS, P.E.; FLAVELL, R.A. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. **J. Immunol.**, v. 165, n.9, p.4773-4777, 2000.
- GOUBIER, A. et al. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. **Immunity.**, v. 29, n. 3, p. 464–475, 2008.
- GOWTHAMAN, U. et al. Promiscuous peptide of 16 kDa antigen linked to Pam2Cys protects against *Mycobacterium tuberculosis* by evoking enduring memory T-cell response. **J. Infect. Dis.**, v. 204, n. 9, p. 1328–1338, 2011.
- GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 50, p. 323-354, 2010.
- GRIMALDI, G.J.R. et al. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.44, n.4, p.645-661, 1991.
- GUIMARÃES-COSTA, A.B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.106, n. 16, p. 6748-6753, 2009
- GÜLER, M. L.; et al. Genetic susceptibility to *Leishmania*: IL-12 responsiveness in TH1 cell development. **Science.**, v. 271, n. 5251, p. 984–987, 1996.
- GULLO, C. A.; TEOH, G. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. **Immunol. Lett.**, v. 94, p.1-10, 2004.
- HANSEN, G. et al. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. **J. Clin. Invest.**, v.105, n. 1, p. 61-70, 2000.
- HARATS, D. et al. Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates *Mycobacterium tuberculosis*-induced and highfat-diet-driven atherosclerotic lesions. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.40, p. 1333e8, 2002.

- HARRINGTON, L.E. et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat. Immunol.**, v. 6, n.11, p.1123–1132, 2005.
- HASKO, G. et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. **FASEB J.**, v.14, p.2065–2074, 2000.
- HAUET-BROERE, F. et al. Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. **Ann. Rheum. Dis.**, v.65 ,p.iii65-68, 2006.
- HEJAZI, S. et al. Interleukin-10 and transforming growth factor- β in early and late lesions of patients with *Leishmania major* induced cutaneous leishmaniasis. **Iran. J. Parasitol**, v. 7, p.16–23, 2012.
- HERWALDT, B. L.; ARANA, B. A.; NAVIN, T. R. The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **J. Infect. Dis.**, v.165, n.3, p. 518-527, 1992.
- HIGGINS, P. J.; WEINER, H. L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. **J. Immunol.**, v.140, n.2, p.440-445,1988.
- HOFT, D. Tuberculosis vaccine development:goals, immunological design, and evaluation. **Lancet**, v. 372, p. 164-175, 2008.
- HUANG, L.; HINCHMAN, M.; MENDEZ, S. Coinjection with TLR2 Agonist Pam3CSK4 Reduces the Pathology of Leishmanization in Mice. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 3, p. e0003546, 2015.
- HUIBREGTSE, I. L. et al. Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* secreting ovalbumin. **Gastroenterology**, v.133, n.2, p.517-528, 2007.
- HYUN, J.G.; BARRETT, T.A. Oral tolerance therapy in inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.** , v.101, n.3, p.569-571, 2006.
- INADA, S. et al. Clonal anergy is a potent mechanism of oral tolerance in the suppression of acute antigen-induced arthritis in rats by oral administration of the inducing antigen. **Cell Immunol.**, v. 175, p.67–75, 1997.
- INDIANI DE OLIVEIRA, C. et al. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. **Microbes Infect.** , v.11, p. 977-984, 2004.
- IVONISE, F. et al. Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical Form of *Leishmania braziliensis* Infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n.11, p. e54–e58, 2002.
- JAYAKUMAR, A. et al . TLR1/2 Activation during Heterologous Prime-Boost Vaccination (DNA-MVA) Enhances CD8⁺ T Cell Responses Providing Protection against *Leishmania (Viannia)*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.5, n. 6, p.e1204, 2011.

- JING, H. et al. Oral administration of *Lactococcus lactis* delivered heat shock protein 65 attenuates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Vaccine**, v. 29, n. 24, p. 4102-4109, 2011.
- JOHN, B.; HUNTER, C. A. Immunology: Neutrophil soldiers or Trojan horses? **Science**, v.321, p. 917-918, 2008.
- JONES, T.C. et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. **J. Infect. Dis.**, v.156, n. 1, p.73-83, 1987.
- KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J. Immunol.** v.166, p.1141–1147, 2001.
- KAUTZ-NEU. K. et al. Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response. **J. Exp. Med.**,v. 208, n. 5, p.885-891, 2011.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.** , v. 9, n.8, p. 604-615, 2011.
- KEDZIERSKI, L.; EVANS, K.J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**., v. 30, p.1-19, 2014.
- KOLLS, J.K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467–476, 2004.
- KRAUS, T.A. et al . Induction of mucosal tolerance in Peyer’s patch-deficient, ligated small bowel loops. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 2234–2243, 2005
- KUMAR, R.; BUMB, R.A.; SALOTRA, P. Correlation of parasitic load with interleukin-4 response in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** , v. 57, n. 3, p.239-246, 2009.
- LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p.811-827, 2005.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. Em: W. Peters and R. Killick-Kendrick, eds.; “The Leishmaniasis in Biology and Medicine”. **Academic Press**, v.1, p.1-119, 1987.
- LAUFS, H. et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 826-835, 2002.
- LI, M.O.; FLAVELL, R. A. TGF-beta: a master of all T cell trades. **Cell.**, v.134, p. 392–404, 2008.
- LI, J.; HUNTER, C.A.; FARRELL, J.P. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. **J. Immunol.**, v. 162, n. 2, p. 974-979, 1999 .

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Immunology**, v.71, n.4, p.556–559, 1990.

LIMA, H. C.; DEKREY, G.K.; TITUS, R. G. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** , v. 94, n 1, p. 71-76, 1999.

LIMA, G. M. et al. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, v. 64, n. 2-3, p.145-151, 1998 .

LINDQUIST, S. E.; CRAIG, A. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.**, v.22, p.631-677, 1988.

LIU, D.; UZONNA, J. E., The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 2, n.83, 2012.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous Leishmaniasis in susceptible mice. **J. Immunol.** , v.182, n. 5, p.3039–3046, 1999.

LUCAS, P.J. et al. Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor beta II receptor. **J. Exp. Med.** , v.191, n. 7, p.1187-1196, 2000.

MA, Y. et al . Distinct characteristics of resistance to *Borrelia burgdorferi*-induced arthritis in C57BL/6N mice. **Infect. Immun.**, v.66, n.1, p.161-168,1998.

MAILLARD, M. H.; SNAPPER, S. B. Teaching tolerance with a probiotic antigen delivery system. **Gastroenterology**, v.133, n.2, p.706-709, 2007.

MARON, R. et al. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 106, n. 13, p. 1708-1715, 2002.

MARSDEN, P. D. et al. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis* skin ulcers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.78, n.4, p.561-562. 1984.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 6, p. 859-876, 1986.

MARTH, T.; STROBER, W.; KELSALL, B. L. High dose oral tolerance in Ova TCR-transgenic mice: Systemic neutralization of interleukin 12 augments TGF-b secretion and T cell apoptosis. **J. Immunol.**, v.157, p. 2348–2357, 1996.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathog. Glob. Health.**, v.110, n. 6, p. 247-260, 2016.

MCGEACHY, M. J. et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. **Nat. Immunol.**, v. 8, n. 12, p. 390–397, 2007.

MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 445–453, 2008.

MEDZHITOV, R.; SCHNEIDER, D. S.; SOARES, M. P. Disease tolerance as a defense strategy. **Science**, v. 335, n. 6071, p. 936–941, 2012.

MELAMED, D.; FRIEDMAN, A. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 935–942, 1993.

MELBY, P.C. et al. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v.62, p. 837–842, 1994.

MENDEZ, S. et al. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. **J. Exp.Med.**, v. 200, p. 201–210. 2004

MERCENIER, A.; MULLER-ALOUF, H.; GRANGETTE, C. Lactic acid bacteria as live vaccines. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 2, n. 1, p. 17–25, 2000.

MEYER, A. L. et al. Rapid depletion of peripheral antigen-specific T cells in TCR-transgenic mice after oral administration of myelin basic protein. **J. Immunol.**, v. 166, p. 5773–5781, 2001.

MILLER, A. et al. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.89, n.1, p.421–425, 1992.

MIYOSHI, A. et al. A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 239, n. 2, p. 205–212, 2004.

MODABBER, F. Experiences with vaccines against cutaneous leishmaniasis: of men and mice. **Parasitology.**, v. 98, p. 49–60, 1989

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHEN-HAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunol. Rev.**, v. 240, p.286–296, 2011.

MOWAT, A.M. The regulation of immune responses to dietary protein antigens. **Immunol. Today.**, v.8, n. 3, p. 93–98, 1987.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 629–644, 2001.

- NAKAO, A. et al. Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. **J. Exp. Med.** , v. 192, n. 2, p. 151-158, 2000 .
- NEAL, R. A.; HALE, C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous Leishmaniasis. **J. Parasitol.**, v.87, p.7-13, 1983.
- NISHIKAWA, M.; TAKEMOTO, S.; TAKAKURA, Y. Heat shock protein derivatives for delivery of antigens to antigen presenting cells. **Int J Pharm**, v.354, n.1-2, p.23-27, 2008.
- NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **J. Immunol.**, v.183, p.8088–8098, 2009.
- O'GARRA, A.; VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nat. Rev. Immunol.** , v.7, n. 6, p. 425-428, 2007 .
- OIDA, T.; WEINER, H. L. TGF-beta induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. **PLoS ONE**, v. 5, p. e15523, 2010.
- OIDA, T., et al. CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta dependent mechanism. **J. Immunol.**, v.170, n.5, Mar 1, p.2516-2522, 2003.
- OLIVEIRA, R. P. et al. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. **J. Immunol. Methods**, v. 421, p. 36–43, 2015.
- OLIVEIRA, F. et al. Lesion size correlates with leishmania antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.85, p. 70–73, 2011.
- OLIVEIRA, W.N. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v.66, p. 127–132, 2014.
- PAMPLONA, A. et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Nat. Med.** , v. 13, n. 6, p. 703-710, 2007.
- PANDEY, S. P. et al . Pegylated Bisacycloxypropylcysteine, a Diacylated Lipopeptide Ligand of TLR6, Plays a Host-Protective Role against Experimental *Leishmania major* Infection. **J. Immunol.**, v.193, n. 7, p. 3632–3643, 2014.
- PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 11, p. 1133–1141, 2005.
- PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.** , v. 14, n. 5, p. 289– 301, 2014.
- PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 1996.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q.; JERÔNIMO, S.M.B. *Leishmania* species: visceral (Kala-Azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: MENDELL, DOUGLAS, BENNETT's **Principles and Practice of Diseases**, 5 ed. Churchill Livingstone, 2000. cap. 265, p. 2831-2842.

PETERS, N. C. et al. Chronic parasitic infection maintains high frequencies of short-lived Ly6C+CD4+ effector T cells that are required for protection against re-infection. **PLoS Pathog.**, v.10 , n. 12, p. e1004538, 2014.

PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** , v. 102, n. 1, p. 79–82, 2011.

PONTES, D. S., et al . *Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. **Protein. Exp. Purif.**, v. 79, n. 2, p.165-175, 2011.

PORROZZI, R. et al. Cross-immunity experiments between different species or strains of *Leishmania* in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Am. J. Trop. Med. Hyg.** , v. 71, n. 3, p. 297-305, 2004.

PRAKKEN, B. J. et al. Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** , v.101, n. 12, p. 4228-4233, 2004.

QUINTANA, F. J. et al. HSP60 as a target of antiertgotypic regulatory T cells. **PLoS One**, v.3, p. e4026, 2008.

QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. The HSP60 immune system network. **Trends Immunol.**, v.32, n.2, Feb, p.89-95, 2010

RÅBERG, L.; GRAHAM, A. L.; READ, A. F. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**,v. 364, n.1513, p. 37-49, 2009.

RACOOSIN, E. L.; BEVERLEY, S. M. *L.eishmania major*: promastigotes induce expression of subset of chemokine genes in murine macrophages. **Exp. Parasitol**, v. 85, p. 283-295, 1997.

RAJAN, T. V. et al . Brugian infections in the peritoneal cavities of laboratory mice: kinetics of infection and cellular responses. **Exp. Parasitol.**, v. 100, n. 4, p. 235–247, 2002.

RAZ, I. et al. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. **Lancet**, v. 358, p. 1749-1753, 2001.

READ, A. F.; GRAHAM, A. L.; RÅBERG, L. Animal defenses against infectious agents: is damage control more important than pathogen control. **PLoS Biol.**, v. 6, n. 12, p. e4, 2008.

RETHI, B.; EIDSMO, L. FasL and TRAIL signaling in the skin during cutaneous leishmaniasis - implications for tissue immunopathology and infectious control. **Front. Immunol.**, v. 3, p. 163, 2012.

REZENDE, R. M. et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4⁺LAP⁺ regulatory T cells. **J. Autoimmun.**, v. 40, p.45–57, 2013.

ROCHA, F.J.S. et al. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 8, p. 3823-3832, 2007.

RONCAROLO, M. G. et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunol. Rev.** , v. 212, p. 28-50, 2006.

RONCAROLO, M. G.; GREGORI, S. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? **Eur. J. Immunol.**, v. 38, n. 4, p. 925-927, 2008.

ROTTIERS P.; DE SMEDT, T.; STEIDLER, L. Modulation of gut-associated lymphoid tissue functions with genetically modified *Lactococcus lactis*. **Int. Rev. Immunol.**, v.28, n.6, p.465-486, 2009.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, v.2; p.845–858, 2002.

SAD, S.; MOSMANN, T. R. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. **J. Immunol.**, v. 153, n. 8, p. 3514-3522, 1994.

SADEGHIAN, G. et al. Evaluation of leishmaniasis skin test and its relationship with the clinical form and duration of cutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Online. J.**, v. 12, n. 7, p. 3, 2006.

SAKAGUCHI, S. et al . 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.**, v.155, n.3, Aug 1, p.1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S. et al . Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v.133, n.5, May 30, p.775-787, 2008.

SALHI, A. et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **J. Immunol.** , v. 180, n. 9, p. 6139-6148, 2008.

SANTIAGO, A. F. et al. Aging correlates with reduction in regulatory-type cytokines and T cells in the gut mucosa. **Immunobiology.**, v. 216, n. 10, p. 1085-1093, 2011.

SCHMID-HEMPEL, P. Evolutionary Parasitology. **Oxford: Oxford University Press**; p. 516, 2011.

SCHMITT, E. et al. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. **J. Leu. Bio.**, v. 81, p. 15-27, 2007.

SCHNEIDER, D.S.; AYRES, J. S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 11, p. 889-895, 2008.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M.E.; CARVALHO, E.M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, p. 483–488, 2008.

SCHWARTZMAN, J. D.; PEARSON, R. D. The interaction of *Leishmania donovani* promastigotes and human fibroblasts in vitro. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 5, p.850-855, 1985 .

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E.M.; WILSON, M.E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 18, p. 6, 2017.

SEIXAS, E. et al. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 106, n. 37, p. 15837-15842, 2009.

SERTORIO, M. et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **J. Immunol.**, v. 180, p. 6139–6148, 2008.

SHI, X.L. et al. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by nasal administration of novel synthetic peptides from heat shock protein 65. **BMC Musculoskelet Disord.**, v.15, p. 253, 2014.

SIMIONI, P. U. et al. Induction of systemic tolerance in normal but not in transgenic mice through continuous feeding of ovalbumin. **Scand. J Immunol.**, v. 60, n. 3, p. 257–266, 2004.

SOONG, L.; HENARD, C. A.; MELBY, P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Semin. Immunopathol.**, v. 34 , n. 6, p. 735-751, 2012.

SPAHN, T. W. et al. Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 1278–1287, 2001.

SPAHN, T. W. et al. Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, p. 1109–1113, 2002.

SPÄTH, G. F. et al. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 97, p. 9258–9263, 2000.

STEIDLER, L. ; ROTTIERS, P. Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1072, Aug, p.176-186, 2006.

STEIDLER, L. et al. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. **Infect. Immun.**, v.66, n.7, Jul, p.3183-3189, 1998

STEIDLER, L. et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. **Science**, v.289, n.5483, Aug 25, p.1352-1355, 2000.

BRASIL. Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde/Secretaria da Saúde do Estado da Bahia (SUVISA): Disponível em:
<http://www.suvisa.ba.gov.br/sites/default/files/BOLETIM%20LTA%202015_0.pdf>.
Acesso em: 12 ag. 2017.

SUTTON, C. et al. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 7, p. 1685–1691, 2006.

TEIXEIRA, M.J. et al. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. **Infect. Immun.**, v.73, n.2, p.1191-1195, 2005.

THEODOS, C. M. et al. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 8, p. 2839–2842 1991.

TSUJI, N. M.; MIZUMACHI, K.; KURISAKI, J. Inter-leukin-10-secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. **Immunology**, v. 103, p. 458–464, 2001.

VAN DEN BROEK, M. F. et al. Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein. **J. Exp. Med.**, v.170, n.2, Aug 1, p.449-466, 1989.

VAN EDEN, W.; WAKSMAN, B. H. Immune regulation in adjuvant-induced arthritis: possible implications for innovative therapeutic strategies in arthritis. **Arthritis Rheum.** , v. 48, n. 7, p.1788-1796, 2003.

VAN EDEN, W.;VAN DER ZEE, R.; PRAKKEN, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 318e30, 2005.

VAN PUIJVELDE, G. H. et al. Induction of oral tolerance to HSP60 or an HSP60-peptide activates T cell regulation and reduces atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 27, n. 12, p. 2677-2683, 2007.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J. Immunol.**, v.173, p. 6521-6525, 2004.

VANDENBROUCKE, K. et al. Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. **Mucosal Immunol.**, v. 3, n. 1, p. 49–56, 2010.

- VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A. et al. Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 7, p. 2948-2956, 2009.
- VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. **J. Immunol.** v.180, p.7537–7545, 2008.
- VAZ, N. M. et al. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 60, n. 2, p. 110–115, 1977.
- VENUPRASAD, K.; CHATTOPADHYAY, S.; SAHA, B. CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. **Hum. Immunol.**, v. 64, n. 1, p. 38-43, 2003.
- VIEIRA, M. G. S. et al. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.979-983, 2002.
- VINEY, J. L. et al. Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. **J. Immunol.**, v. 160, n. 12, p. 5815–5825, 1998.
- VON DER WEID, T. et al. Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4+NK1.1-T cell population. **J. Immunol.**, v.157, p.4421–4427, 1996.
- VON STEBUT E. et al. Interleukin 1 α promotes Th(1) differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major* – susceptible BALB/c mice. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 2, p. 191–199, 2003.
- WALTER, S.; BUCHNER, J. Molecular chaperones cellular machines for protein folding. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 41, p. 1098-1113, 2002.
- WEINER, H. L. et al. Oral tolerance. **Immunol. Rev.**, v.241, n.1, May, p.241-259, 2011.
- WELLS, J.M.; MERCENIER, A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. **Nature**, v. 1038, p. 1-14, 2008.
- WHITACRE, C. C. et al. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. **J. Immunol.**, v. 147, p. 2155–2163, 1991.
- WIETEN, L. et al. IL-10 is critically involved in mycobacterial HSP70 induced suppression of proteoglycan-induced arthritis. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4186, 2009.
- WILHELM, P. et al. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking tnf. **J Immunol.**, v. 166, n. 6, p. 4012–4019, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em:

<<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leishdis1.html>>. Acesso em: 10 ago 2017.

YAMAZAKI, S. et al. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo. **PLoS One.**, v. 6, n. 4, p. e18833, 2011.

ZAMBRANO-VILLA, S. et al. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol.**, v.18, n.6, p.272-278, 2002.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein60inhibits Th1-mediated hepatitis model via innateregulationofTh1/ Th2 transcription factors and cytokines. **J. Immunol.**, v. 174, p. 3227-3236, 2005.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 2022-2032, 2006.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. **FASEB J.**, v. 17, p. 1567-1569, 2003.

ZHANG, Z. J. et al. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 88, n. 22, p.10252-10256, 1991.

ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F. et al. Immunization with pVAXHsp65 decreases inflammation and modulates immune response in experimental encephalomyelitis. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 5, p. 287–297, 2010.