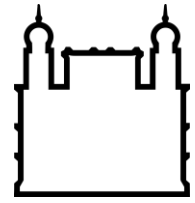




UFBA

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



FIOCRUZ

Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***LACTOCOCCUS LACTIS* PRODUTORA DE HSP65 COMO ALTERNATIVA
TERAPÊUTICA COMPLEMENTAR PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA
CAUSADA POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

CAMILA MATTOS ANDRADE

Salvador - Bahia

2022

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

Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana

***LACTOCOCCUS LACTIS* PRODUTORA DE HSP65 COMO ALTERNATIVA
TERAPÊUTICA COMPLEMENTAR PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA
CAUSADA POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

CAMILA MATTOS ANDRADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestra.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Coorientadora: Profa. Dra. Priscila Valera Guerra

Salvador - Bahia

2022

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

A5541 Andrade, Camila Mattos

Lactococcus lactis produtora de HSP65 como alternativa terapêutica complementar para leishmaniose cutânea causada por *leishmania braziliensis*. / Camila Mattos Andrade. _ Salvador, 2022.

85 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Coorientadora: Profa. Dra. Priscila Valera Guerra

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Hsp65. 2. Leishmaniose. 3. Leishmania braziliensis. Tolerância oral. I. Título.

CDU 616.993.161

**"LACTOCOCCUS LACTIS PRODUTOR DE HSP65 COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA
COMPLEMENTAR PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR LEISHMANIA
BRAZILIENSIS".**

Camila Mattos Andrade

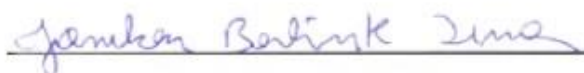
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 24 de março de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar
Professora
UFBA



Dr. Jonilson Berlink Lima
Professor
UFOB



Dra. Cláudia Ida Brodskyn
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”
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, sempre acreditando no meu potencial.

À minha coorientadora e amiga, Dra. Priscila Valera, por toda paciência e companheirismo desde meu período de Iniciação científica até hoje, sua amizade e orientação foi essencial na minha trajetória.

Ao grupo das “Mucosetes”, composto por Priscila Valera e Ivanéia Nunes, com quem compartilhei diversos momentos de alegria e desespero, mas com vocês tudo se tornava divertido e leve.

Às minhas amigas do laboratório, Elaine Carvalho pelos abraços apertados e conselhos sábios que me confortavam e Sara Nunes, por todo carinho e atenção com sua doçura e inteligência e pelas belíssimas imagens criadas para este trabalho.

Aos meus amigos do laboratório, Ícaro Bonyek pelas longas discussões e colaborações no trabalho, Rafael Tibúrcio por toda atenção e paciência desde o início com as análises da citometria de fluxo e seu senso de humor inconfundível e Léon Dimitri, meu colega e amigo com quem compartilhei muitos momentos especiais na Iniciação Científica.

À Dra. Ana Caetano e Dra. Tatiani Maiolli da UFMG, por ter nos cedido as cepas utilizadas neste trabalho e pelas colaborações durante toda a construção do trabalho.

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

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 toda minha família, em especial aos meus pais, Emília Mattos e Valnei Andrade, por sempre lutarem com todas as forças para me garantir uma educação de qualidade, por acreditarem em mim e nunca me deixarem desistir.

À minha vó paterna, Jesuita Andrade, por me conceder um lar e uma comida caseira quando eu precisava durante toda a minha vida, sua presença fez toda a diferença.

Aos meus tios Carine Andrade e Guilherme Ribeiro, quem me inspiraram na carreira científica e sempre me impulsionaram para buscar o conhecimento.

Aos meus amigos da vida, minha segunda família, em especial à Jamily Luiza, Camilla Lessa, Tayane Carvalho, Thaylla Queiroz, Ellen Pimentel, Clara Porto, por sempre me apoiarem em diversos obstáculos e compartilhar tantos momentos felizes e especiais.

À minha psicóloga, Andressa, por ter caminhado comigo durante boa parte deste processo e ter me ajudado a alcançar uma fase de maior autoconhecimento.

À Universidade Federal da Bahia e ao Departamento de Patologia e Medicina Legal/ Faculdade de Medicina - UFBA, pelo vínculo do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

ANDRADE, Mattos Camila. *Lactococcus lactis* produtora de Hsp65 como alternativa terapêutica complementar para leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis* 2022. 85 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose é um conjunto de doenças negligenciadas, e uma das suas formas mais frequente no Brasil é a leishmaniose cutânea causada *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*). Esta forma clínica é caracterizada por lesões cutâneas únicas na forma de úlcera com bordas elevadas e fundo necrótico, causada principalmente pela resposta inflamatória exacerbada, induzida por células Th1 produtoras de IFN- γ e apresentando um número reduzido de parasitas no local da lesão. Em modelos de doenças autoimunes e inflamatórias, o uso da indução de tolerância oral (TO) tem se mostrado promissor no desenvolvimento de estratégias terapêuticas, pois os mecanismos regulatórios gerados pela TO diminuem a inflamação causada nestas doenças. Trabalhos da literatura têm mostrado que as *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), bactérias lácticas, não patogênicas e Gram-positivas são boas ferramentas para a indução da TO. Neste trabalho, utilizamos a cepa recombinante de *L. lactis* geneticamente modificada produtora da proteína de choque térmico 65 (Hsp65) derivada do *Mycobacterium leprae*. A Hsp65 possui um papel regulador importante no sistema imune, modulando principalmente respostas inflamatórias devido a sua capacidade de inibir a produção de citocinas, como TNF e IFN- γ , e de aumentar IL-10 pelas células T regulatórias (Tregs). **OBJETIVO:** Avaliar o potencial terapêutico da administração oral de *L. lactis* produtoras de Hsp65, como tratamento imunomodulador em modelo experimental de leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c. **MÉTODO:** Camundongos BALB/c foram desafiados na orelha com promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis*. Após quatro semanas de infecção, os animais foram tratados por via oral com *L. lactis* produtoras ou não de Hsp65 durante quatro dias consecutivos. Nos diferentes grupos de animais avaliou-se a espessura da lesão, a carga parasitária, citocinas produzidas pelas células dos linfonodos drenantes da lesão e a frequência de células Tregs envolvidas na indução da TO durante todo o período de infecção. **RESULTADOS:** O acompanhamento semanal da espessura das lesões durante a infecção mostrou que, os animais tratados por via oral com *L. lactis* produtora de Hsp65 desenvolveu lesões menores e apresentaram uma menor destruição tecidual após o tratamento comparados aos animais dos grupos controles (Lb e Lb/Ø). O tratamento oral com Hsp65 reduziu a carga parasitária a partir de 6 semanas de infecção em relação aos animais que não receberam Hsp65. Foi observado também uma redução na produção de IFN- γ nos linfonodos drenantes da lesão dos animais tratados com Hsp65 seguido de um aumento de IL-10, evidenciando um balanço entre a produção de citocinas pro- e anti-inflamatórias. O tratamento oral com *L. lactis* produtora de Hsp65 também promoveu o aumento da frequência de células Tregs como CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺LAP⁺ (TGF- β associado à membrana) nos linfonodos drenantes da lesão causada por *L. braziliensis*. **CONCLUSÕES:** A utilização da TO utilizando a proteína heteróloga Hsp65 apresenta boas perspectivas para seu emprego no tratamento da leishmaniose cutânea.

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

ANDRADE, Mattos Camila. **Hsp65-producing *Lactococcus lactis* as a complementary therapeutic alternative for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis***. 2022. 85 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leishmaniasis is a group of neglected diseases, and one of its most frequent forms in Brazil is cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*). Unique cutaneous lesions characterize this clinical form as an ulcer with raised edges and necrotic background, mainly driven by an exacerbated inflammatory response induced by IFN- γ -producing Th1 cells and presenting a reduced number of parasites at the lesion site. In models of autoimmune and inflammatory diseases, oral tolerance (OT) induction has shown promise in developing therapeutics, as the regulatory mechanisms generated by OT decrease the inflammation caused by these diseases. Literature studies have demonstrated that *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), non-pathogenic and Gram-positive lactic bacteria are good tools for the induction. This work used the genetically modified recombinant strain *L.lactis*-producing heat shock protein 65 (Hsp65) derived from *Mycobacterium leprae*. Hsp65 has an essential regulatory role in the immune system, mainly modulating inflammatory responses due to its ability to inhibit the production of cytokines, such as TNF and IFN- γ , and to increase IL-10 by regulatory T cells (Tregs). **OBJECTIVE:** To evaluate the therapeutic potential of oral administration of Hsp65-producing *L. lactis* as an immunomodulatory treatment in an experimental model of cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis* in BALB/c mice. **METHOD:** BALB/c mice were challenged in the ear with *L. braziliensis* metacyclic promastigotes. After four weeks of infection, the animals were treated orally with *L. lactis* producing or not producing Hsp65 for four consecutive days. In the different groups of animals, the thickness of the lesion, the parasite load, cytokines produced by the cells of the lymph nodes draining the lesion and the frequency of Tregs cells involved in the induction of TO during the entire infection period were evaluated. **RESULTS:** Weekly monitoring of lesion thickness during infection showed that animals treated orally with Hsp65-producing *L. lactis* developed smaller lesions and showed less tissue destruction after treatment than animals in the control groups (Lb and Lb/Ø). Hsp65-oral treatment reduced the parasite load from 6 weeks of infection compared to those that not receive Hsp65. It was also observed a reduction in that he production of IFN- γ in the lymph nodes draining the lesion of the animals treated with Hsp65 followed by an increase in IL-10, evidencing a balance between the production of pro- and anti-inflammatory cytokines. Oral treatment with Hsp65-producing *L. lactis* also increased the frequency of Treg cells such as CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺LAP⁺ (membrane-associated TGF- β) in the draining lymph nodes of the lesion caused by *L. braziliensis*. **CONCLUSIONS:** The use of TO using the heterologous protein Hsp65 presents good prospects for its use in the treatment for leishmaniasis.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Status de endemividade da Leishmaniose Cutânea no mundo, 202	15
Figura 2	Distribuição de espécies de Leishmania responsáveis pela transmissão de leishmaniose tegumentar, Brasil, 2005	17
Figura 3	Ciclo de vida da Leishmania	18
Figura 4	Indução e manutenção da tolerância oral	27
Figura 5	Desenho experimental dos estudos <i>in vivo</i>	36
Figura 6	Representação dos vetores de expressão pXyIT:SEC:Hsp65	40
Figura 7	<i>Dot plots</i> das estratégias de gating para a análise das populações de células T regulatórias por citometria de fluxo	45
Figura 8	Cinética do desenvolvimento das lesões cutâneas em camundongos BALB/c administrados com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 após a infecção por <i>L. braziliensis</i>	48
Figura 9	Cinética da carga parasitária da orelha e do linfonodo drenante da lesão de camundongos BALB/c administrados por via oral com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 após a infecção por <i>L. braziliensis</i>	50
Figura 10	Cinética da produção de citocinas pro- e anti-inflamatórias e a razão da produção IL-10/IFN- γ das células do linfonodo drenante da lesão de camundongos BALB/c administrados com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 após a infecção por <i>L. braziliensis</i>	52
Figura 11	Frequência das células T regulatórias CD4 ⁺ LAP ⁺ e CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ no linfonodo drenante da lesão de camundongos BALB/c administrados com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 após a infecção por <i>L. braziliensis</i>	53
Figura 12	Desenvolvimento das lesões causadas pela infecção por <i>L. braziliensis</i> em camundongos BALB/c tratados com Hsp65	54
Figura 13	Escore inflamatório e análise histopatológica das lesões nas orelhas dos camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados com <i>L. lactis</i> produtora de Hsp65	56
Figura 14	Resumo gráfico da hipótese do trabalho e dos resultados	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.	38
Tabela 2	Lista de anticorpos utilizados na citometria de fluxo, com seus respectivos marcados, fluórocromos e seus fabricantes.	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BL	Bactérias lácticas
CCL4	Ligantes de quimiocina CC 4
CCR	Receptor de quimiocinas
DCs	Células dendríticas
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
DTH	Tipo de hipersensibilidade tardia
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino
GRAS	Generally regarded as safe
Hsps	Heat shock proteins
IELs	Linfócitos intra-epiteliais
IL	Interleucinas
IFN-γ	Interferon gamma
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
PP	Placas de Peyer
LAP	Latency-associated peptide
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCM	Leishmaniose mucocutânea
LD	Leishmaniose difusa
LNm	Linfonodo mesentérico
LP	Lâmina própria
LT	Leishmaniose tegumentar
NO	Óxido nítrico
NK	Natural killer
OGM	Organismo geneticamente modificado
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde/World Health Organization
OVA	Ovalbumina
PAHO	Organização Pan-Americana da Saúde/Pan American Health Organization
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PMNs	Células polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões

NETs	Neutrophils Extracellular Traps
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SESAB	Secretaria de Saúde do Estado da Bahia
SisLeish	Sistema de Informação Regional para Leishmanioses nas Américas SVS/MS Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
TGF-β	Fator de transformação do crescimento
Th	T helper
TLR	Toll-like receptors

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	LEISHMANIOSE E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	15
1.2	VETOR, AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO	16
1.3	CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	19
1.4	RESPOSTA IMUNE CONTRA INFECÇÃO POR LEISHMANIA	20
1.5	MODELOS EXPERIMENTAIS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA	22
1.6	TOLERÂNCIA ORAL	24
1.7	AS BACTÉRIAS LÁCTICAS E <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i>	30
1.8	PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs)	32
2	JUSTIFICATIVA	34
2.1	HIPÓTESE	35
2.2	OBJETIVOS	35
2.2.1	Objetivo geral	35
2.2.2	Objetivos específicos	35
3	DESENHO EXPERIMENTAL	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	ANIMAIS	37
4.2	PARASITAS	37
4.3	INFECÇÃO EXPERIMENTAL	37
4.4	OBTENÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS E ACONDICIONAMENTO MICROBIOLÓGICO	38
4.5	INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA CEPA <i>LACTOCOCCUS</i> <i>LACTIS</i> RECOMBINANTE	40
4.6	ADMINISTRAÇÃO POR VIA ORAL DO TRATAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
4.7	DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA	42
4.8	CULTURA DE CÉLULAS	42
4.9	DOSAGEM DE CITOCINAS PRO E ANTI-INFLAMATÓRIAS	43
4.10	ANÁLISE DA CITOMETRIA DE FLUXO E ESTRATÉGIA DE GATING	44
4.11	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES	45
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46

5	RESULTADOS	47
5.1	CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS POR VIA ORAL COM <i>L. LACTIS</i> PRODUTOR DE HSP65 APÓS A INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	47
5.2	ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA NO SÍTIO DA INFECÇÃO (ORELHA) E NOS LINFONODOS DRENANTES DA LESÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS APÓS A INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	48
5.3	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS IFN- γ , IL-10, TGF- β E IL-4 PELAS CÉLULAS DO LINFONODO DRENANTE DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS COM HSP65 APÓS A INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	50
5.4	AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T REGULADORAS NAS CULTURAS DE CÉLULAS DOS LINFONODOS DRENANTES DA LESÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS COM <i>L. LACTIS</i> -HSP65 APÓS A INFECÇÃO	52
5.5	ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS COM HSP65 APÓS A INFECÇÃO	54
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	67
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A leishmaniose constitui um complexo de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania spp.* com mais de 20 espécies conhecidas ao redor do mundo. Existem duas principais formas da doença: a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como kala-azar e a leishmaniose tegumentar (LT), que é a forma mais comum (WHO, 2021). Estima-se que a leishmaniose é uma das principais doenças negligenciadas no mundo (ALVAR et al., 2012).

As leishmanioses estão presentes e continuam sendo um dos principais problemas de saúde no mundo: noventa e dois países são endêmicos para LT e oitenta e três para LV (WHO, 2021). Atualmente, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 1 bilhão de pessoas estão em áreas endêmicas com risco de infecção e estima-se que ocorram mais de 1 milhão de casos de LT anualmente (Figura 1). Em 2019, 53 países endêmicos para LT reportaram dados para o Programa Global de Leishmaniose da OMS. Neste mesmo ano, o Brasil registrou 15.484 casos de LT e ficou entre os 12 países com maiores número de casos, totalizando 91% da incidência global para esta forma da doença (WHO, 2020).

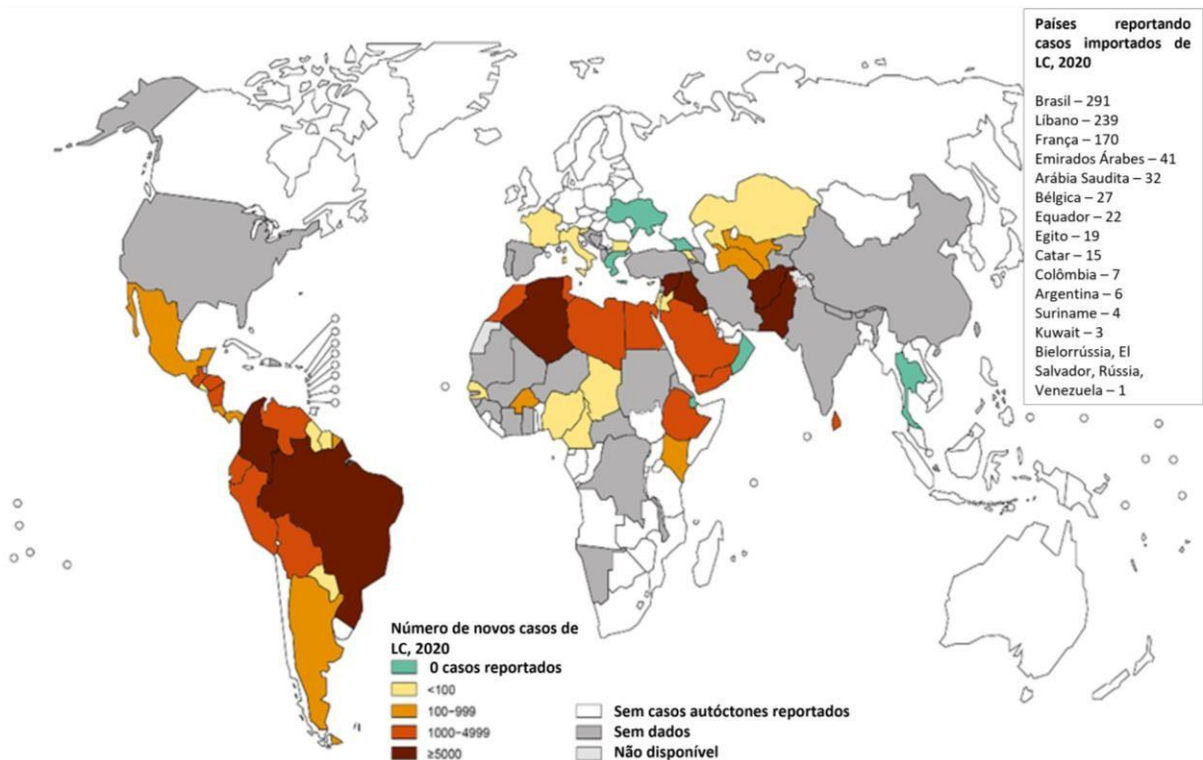


Figura 1 - Status de endemicidade da Leishmaniose Cutânea no mundo, 2020.
Fonte: (WHO, 2021).

No Brasil, entre 2003 e 2018 foram registrados mais de 300.000 casos de LT, com uma média 21.528 casos por ano. Existem registros de LT em todas as unidades federativas, no entanto, neste período foi observado que a região Norte reportou maior número de casos, seguida da região Nordeste (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Na Bahia, a LT esteve presente em 195 (46,76%) municípios do Estado. Segundo a Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB), a análise do histórico de casos e incidência de 2003 a 2020 mostrou que a doença possui ampla distribuição, sendo registrados um total de 35.256 novos casos confirmados de LT na Bahia com a média anual de 2.712 casos (SESAB, 2020).

Em 2017, segundo o Sistema de Informação Regional para Leishmanioses nas Américas (SisLeish), os casos de LC no Brasil ocorreram em todas as idades, no entanto, a faixa etária de > 20 anos < 50 anos foi predominante (PAHO/WHO, 2019). Na Bahia, em 2020, houve uma predominância de casos confirmados para LT em indivíduos do sexo masculino, na faixa etária economicamente ativa de 20 a 34 anos, de raça parda e com baixa escolaridade (SESAB, 2020). Desta forma, a LT representa um importante problema de saúde pública no Brasil, devido a sua alta incidência e ampla distribuição, especialmente na Bahia onde já foram detectados casos nos maiores centros urbanos. Além disso, a doença assume um importante papel socioeconômico pelo risco dos pacientes, principalmente das formas mucocutânea e cutânea difusa, desenvolverem lesões desfigurantes, até mesmo incapacitantes, sendo consideradas como doenças ocupacionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

1.2 VETOR, AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO

As leishmanioses são causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (Ordem: Kinetoplastida; Família: *Trypanosomatidae*), que tem seu ciclo biológico realizado em dois hospedeiros: vertebrados (canídeos, felinos, marsupiais, raposas, roedores e humanos) e invertebrado (flebotomíneo) (ANTONIOU et al., 2013; DE OLIVEIRA LARA-SILVA et al., 2015; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Durante seu ciclo de vida, o parasita assume duas formas evolutivas distintas: a promastigota que se apresenta na forma flagelada, fusiforme, são móveis e extracelulares, são encontradas no intestino médio do flebotomíneo; e a amastigota que possui uma forma arredondada, são imóveis, obrigatoriamente intracelulares, sendo encontradas parasitando as células fagocitárias do hospedeiro mamífero (ALEXANDER et al., 1999).

Os vetores da doença são os insetos fêmea de flebotomíneos que pertencem à ordem Díptera e família *Psychodidae*, que fazem parte de diferentes gêneros: *Lutzomyia* no novo

Mundo (Américas) e *Phlebotomus* no Velho Mundo. (BATES, 2007; LAINSON; RANGEL, 2005). Além disso, a transmissão da doença é realizada através da picada do vetor durante o repasto sanguíneo, por isso somente as fêmeas são consideradas transmissoras pelo fato de serem hematófagas (GAUDÊNCIO et al., 2015; READ, 1979) . No Brasil, as principais espécies de vetores envolvidos na transmissão da LT são *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. umbratilis*, *Lu. wellcomei*, *Lu. flaviscutellata* e *Lu. migonei* (LAINSON; RANGEL, 2005).

Nas Américas já foram identificadas 11 espécies de *Leishmania* consideradas causadoras da LT em humanos (COSTA, 2005). No Brasil, já foram reconhecidas 7 espécies de *Leishmania* como agentes etiológicos da doença, sendo seis destas do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. Atualmente, as três principais espécies conhecidas são: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*; além de outras espécies do subgênero *Viannia* que foram identificadas na região Norte e Nordeste: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*. As espécies *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) e *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*) são as principais causadoras de LT na Bahia (Figura 2) (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

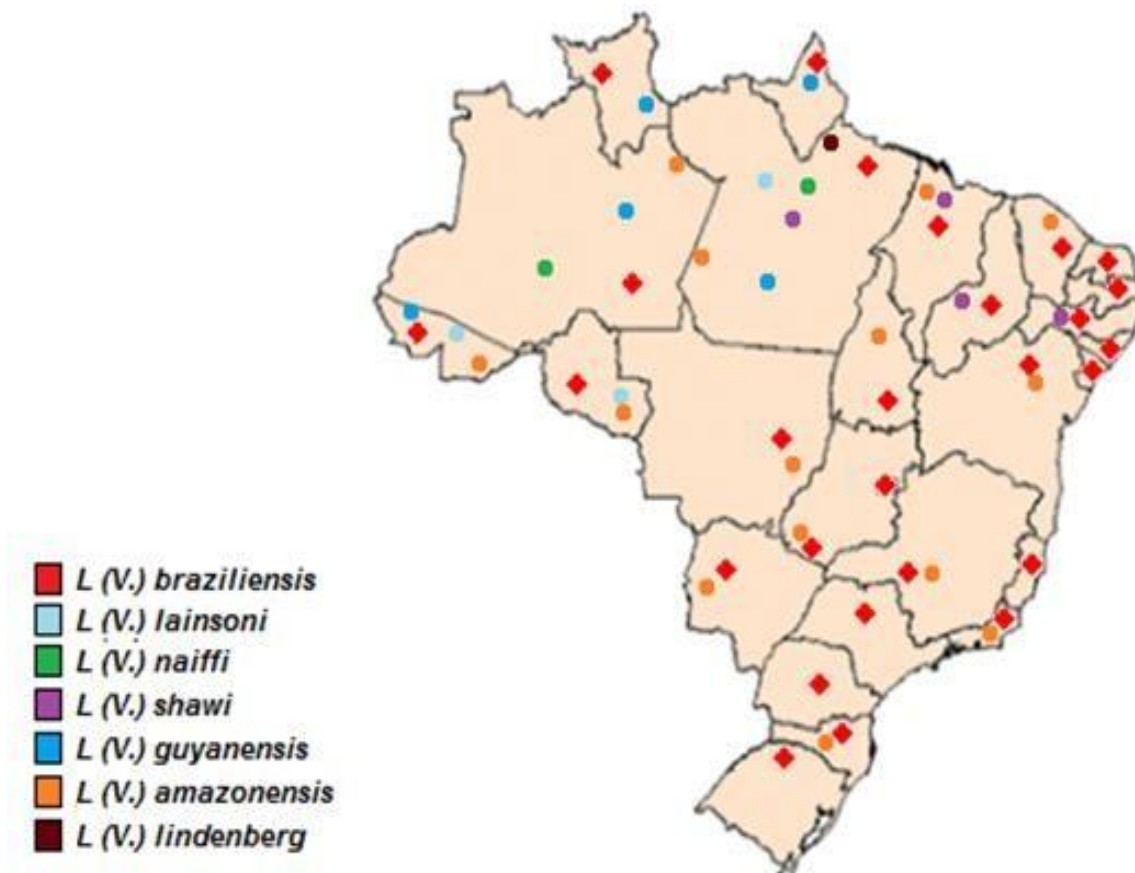


Figura 2 - Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão de leishmaniose tegumentar, Brasil, 2005.

Fonte: Adaptado de (SVS/MS, 2005)

O ciclo biológico da *Leishmania* começa no intestino médio do vetor flebotomíneo, onde as promastigotas procíclicas de *Leishmania* se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectantes. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo infectado regurgita as promastigotas metacíclicas na pele do indivíduo. Além disso, são liberados componentes do vetor imunomodulatórios, importantes para o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado. Então, os parasitas *Leishmania* serão fagocitados por diversos tipos celulares presentes no local, como macrófagos e neutrófilos (KAYE; SCOTT, 2011). Os macrófagos são as células hospedeiras das *Leishmania* onde ocorre a proliferação dos parasitas (ANTOINE et al., 1998). Após as metacíclicas de *Leishmania* estarem presentes nos fagolisossomos dos macrófagos, elas se diferenciam em amastigotas. As amastigotas se replicam na célula do hospedeiro, que se rompe quando existem uma grande quantidade de parasitas no seu interior, permitindo a reinfecção em outras células fagocíticas locais. O ciclo de transmissão da *Leishmania sp.* se fecha quando os fagócitos infectados são ingeridos por outro flebotomíneo durante um novo repasto sanguíneo. Assim também, as amastigotas sofrem uma série de alterações morfológicas no flebotomíneo, onde se transformam em promastigotas metacíclicas infectantes (KAYE; SCOTT, 2011) (Figura 3).

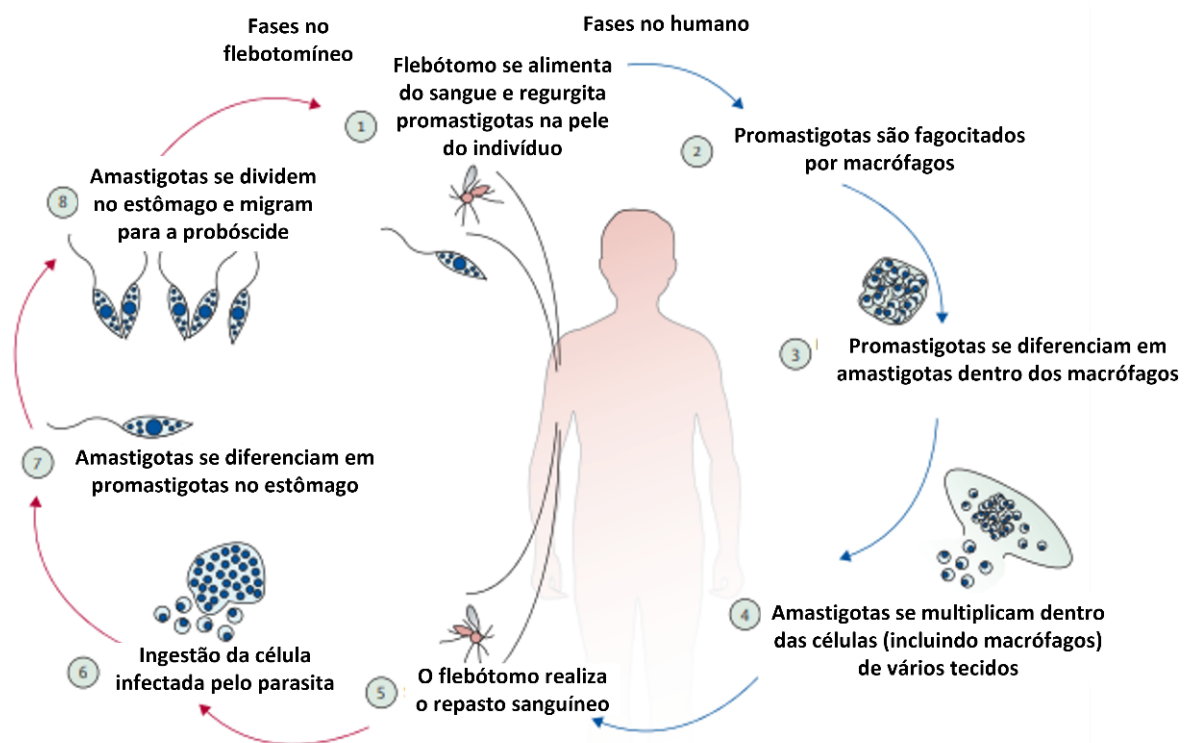


Figura 3 - Ciclo de vida da *Leishmania*.

Fonte: Adaptado de (REITHINGER et al., 2007).

1.3 CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A maioria das infecções por *Leishmania spp.* ocorre através da entrada de parasitas pela pele do hospedeiro vertebrado, no entanto o conjunto de manifestações clínicas causado por este protozoário é bastante variável, e está ligado diretamente com a identificação das espécies infectantes e a resposta imune do hospedeiro (COSTA, 2005). A LT é a forma mais comum e é caracterizada pela formação de lesões ulceradas ou nodulares, que geralmente ocorrem em áreas expostas do corpo como face, braços, pernas e pés (Revisto em BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PACE, 2014). Esta forma clínica ainda pode ser classificada em 4 subtipos de manifestações clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LD) e leishmaniose cutânea disseminada (LCD) (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996).

A LC é a forma mais frequente da doença, caracterizada por causar lesões únicas circulares, ulceradas, com bordas elevadas e possuem um fundo necrótico com aspecto granuloso. Estas lesões apresentam cura espontânea, no entanto o tempo de resolução pode levar semanas ou meses, e mesmo evoluindo para a cura, as lesões podem deixar cicatrizes atróficas estigmatizantes, com hipo ou hiperpigmentação (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). No Brasil, o principal agente etiológico causador da LC é a *Leishmania braziliensis* (CONVIT et al., 1993; MARSDEN et al., 1984; SILVEIRA et al., 2008, 2009).

A LMC é caracterizada pela migração dos parasitos de lesões ulceradas simples na pele para lesões destrutivas na mucosa, tanto da nasofaríngea quanto da orofaríngea. Essas lesões apresentam um número bastante reduzido de parasitas com uma resposta inflamatória exacerbada, causada pela alta produção de interferon-gama (IFN- γ) (maior do que visto na LC), em conjunto com a baixa produção de interleucina 10 (IL-10), o que impede a modulação da resposta pro-inflamatória e determina a destruição tecidual presente nesta forma clínica (MARSDEN, 1986; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). O principal agente etiológico da LMC é *L. braziliensis*, que neste caso é capaz de persistir na lesão após a cura e metastizar para a mucosa (DE OLIVEIRA GUERRA et al., 2011).

Em casos de LD, os indivíduos apresentam um número grande de lesões papulares ou nodulares causadas pela disseminação de parasitas por vias linfáticas e hematogênicas (MARSDEN, 1986). As lesões ocorrem com frequência nas regiões da face e do tronco dos pacientes (CARVALHO et al., 1994). Apesar destas lesões não apresentarem uma cura espontânea, a LD não oferece um risco de morte aos pacientes acometidos com a doença. No entanto, o diagnóstico tardio e precário pode acarretar o aumento do tamanho das lesões e o

desenvolvimento de lesões bacterianas secundárias (DAVID; CRAFT, 2009). As principais espécies causadoras da LD são *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996; VIEIRA et al., 2002).

A LCD é principalmente causada pela *L. amazonensis*, caracterizada pela formação de lesões múltiplas não-ulcerativas com aparência papular ou nodular contendo muitos parasitas (HANDLER et al., 2015; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). As lesões podem apresentar variados tamanhos e em diferentes regiões do corpo. A ausência de ulceração e o crescimento descontrolado de amastigotas é consequência, principalmente, da falta de uma resposta imune celular específica nesta forma da doença (BARROSO et al., 2018; CAMPOS et al., 2018; SILVEIRA et al., 2008).

1.4 RESPOSTA IMUNE CONTRA INFECÇÃO POR LEISHMANIA

A resposta imunológica na LC é iniciada por células imunes inatas residentes na pele. Estas células possuem receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que interagem com os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPS) da *Leishmania* (LIU; UZONNA, 2012; SACRAMENTO et al., 2017), levando a uma resposta caracterizada pela produção de mediadores inflamatórios.

Além disso, interações coordenadas entre os mecanismos mediados por células imunes inatas e a ativação de populações de células T específicas levam à produção de citocinas inflamatórias que amplificam a resposta contra os parasitas levando à sua eliminação, porém com destruição tecidual, sendo uma das causas da patogênese da doença (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018; SCOTT; NOVAIS, 2016). Um exemplo deste fato é a exacerbação da resposta observada na leishmaniose mucocutânea, onde o número de parasitas é bastante baixo e a lesão é extensa. (BACELLAR et al., 2002). Portanto, a resposta imune do hospedeiro na LC está implicada tanto na proteção quanto na imunopatologia da doença (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Após a infecção na pele do hospedeiro através da picada do flebotomíneo, promastigotas metacíclicas infectantes de *Leishmania spp.* têm a necessidade de se esquivar da imunidade inata para sobreviver e se replicar dentro das células. Durante a picada, os vasos dérmicos superficiais são atingidos dando origem a um lago sanguíneo, concomitantemente, são depositadas substâncias da saliva do flebotomíneo, como vasodilatadores e antiagregantes plaquetários, que facilitam a inoculação e veiculação dos parasitos na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (ROHOUŠOVÁ; VOLF, 2013). Após a inoculação dos parasitos no indivíduo, diferentes tipos celulares são ativados no sítio da infecção, como macrófagos e

células dendríticas (DCs), recrutam outras células responsáveis pela eliminação do patógeno e sua interação com os parasitas influenciam de forma significativa no desfecho da infecção.

Diversos estudos demonstram que os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas, rapidamente chegam no sítio da infecção e são responsáveis pela eliminação do parasita através da indução da morte intracelular após fagocitose ou através da morte extracelular pela liberação de uma rede de fibras que se ligam a patógenos chamadas *Neutrophils Extracellular Traps* (NETs), constituídas por cromatina e proteínas granulares (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009; HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016). Uma vez que os neutrófilos são considerados fagócitos de vida curta, acredita-se que estas células são utilizadas com “cavalos de Tróia” pelos parasitas como uma estratégia de entrar silenciosamente nos macrófagos sem ativá-los. Além disso, os parasitas inibem os sinais apoptóticos celulares dos neutrófilos, com o objetivo de aumentar sua vida útil e a disseminação dos parasitas, impedindo que estas células sejam capazes de matar a *Leishmania* (AGA et al., 2002; LAUFS et al., 2002; VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

Um outro papel muito importante dos neutrófilos é a produção da quimioquina CCL4, responsável em promover o recrutamento dos macrófagos e DCs, que participam na fagocitose de neutrófilos apoptóticos. Quando recrutados, os macrófagos fagocitam as células polimorfonucleares (PMNs) infectadas, bem como, parasitas livres, e se tornam a célula hospedeira definitiva, tanto para a replicação quanto na eliminação do parasita (LIU; UZONNA, 2012; VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

Após a internalização dos parasitas pelos macrófagos, há a formação do fagolisossomo, onde as formas promastigotas se diferenciam rapidamente em amastigotas que são mais resistentes ao sistema imunológico do hospedeiro, adaptando-se ao pH ácido do meio (WALKER et al., 2014; ZAMBRANO-VILLA et al., 2002). Os macrófagos possuem duas vias distintas de ativação que podem determinar tanto a replicação do parasita quanto a eliminação do patógeno. Na via clássica, dois principais mecanismos responsáveis pelo controle da infecção por *Leishmania* são a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), gerada pelo “burst” respiratório que ocorre durante a fagocitose e o Óxido Nítrico (NO), produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A principal citocina responsável pela ativação destas células é o IFN- γ , produzido por células Natural Killers (NK) e T helper do tipo 1 (Th1) (BRONTE; ZANOVELLO, 2005; LIEW, 1990; (MARQUES-DA-SILVA et al., 2018).

Além disso, os parasitas também podem ser fagocitados por DCs. Estas células infectadas produzem interleucina 12 (IL-12), essencial para a geração de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ (OKWOR; UZONNA, 2016). Por outro lado, outras células residentes da

pele (por exemplo, queratinócitos e células T CD4⁺ que possuem o receptor Vβ4) produtoras de interleucina 4 (IL-4) induzem o desenvolvimento de células T helper do tipo 2 (Th2). Células T CD4⁺ Th2 produzem IL-4 e interleucina 13 (IL-13), o que leva à ativação alternativa dos macrófagos, aumento da atividade da arginase e da produção de poliaminas, favorecendo a replicação do parasita (LIU; UZONNA, 2012). Assim também, a infecção por *Leishmania* pode induzir uma resposta anti-inflamatória, com a produção de citocinas como IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) que inibem e desativam as funções dos macrófagos, afetando negativamente na atividade anti-leishmania destas células infectadas, o que contribui para a sobrevivência do parasita (BELKAID et al., 2001; CARNEIRO et al., 2020; LIU; UZONNA, 2012).

1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Os trabalhos, utilizando modelos experimentais com foco na resposta imune contra à infecção por *Leishmania*, têm contribuído na elucidação dos mecanismos envolvidas na patogênese e na proteção na infecção por *Leishmania*. Inicialmente, a maioria dos estudos de resistência e susceptibilidade em LC foram desenvolvidos em modelos experimentais à infecção por *L. major* em murinos (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Camundongos C57BL/6 infectados por *L. major* apresentam células T CD4⁺ diferenciadas em um perfil Th1, caracterizada pela produção de interleucina 12 (IL-12) e IFN-γ, que ativa os macrófagos, e leva à indução de mecanismos de destruição do parasita. A produção de IL-12 por DCs é essencial para o desenvolvimento de células T CD4⁺ com função protetora pela indução dos mecanismos de morte do parasita (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Por outro lado, camundongos BALB/c infectados por *L. major* desenvolvem uma resposta com um perfil Th2, caracterizada pela produção de IL-4, levando à susceptibilidade/progressão da doença devido a presença de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

A IL-10 tem um papel importante na modulação da resposta à infecção, diminuindo a inflamação, mas ao mesmo tempo permitindo a sobrevivência de alguns parasitas. Isso foi demonstrado em camundongos deficientes de IL-10, quando infectados com baixas doses de *L. major*, foram capazes de eliminar todos os parasitas, levando a uma cura estéril (BELKAID et al., 2001). Sendo assim, a diferenciação em respostas Th1 ou Th2 está associada com a resistência/cura e susceptibilidade/cronicidade da doença, respectivamente. Deve-se considerar, entretanto, que a resistência e suscetibilidade à infecção é multifatorial, sendo um

desses fatores a espécie de *Leishmania* envolvida e o modelo experimental utilizado (BOGDAN et al., 1996; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

O modelo utilizando a espécie *L. major* criou um paradigma entre susceptibilidade e resistência à LC, que não é aplicável para o estudo da doença em humanos, assim como em outros modelos experimentais de leishmanioses. Assim, as espécies do Velho e Novo Mundo apresentam divergências no desenvolvimento de estratégias para sobreviver dentro dos sítios de infecção, e não somente, existem diferentes fatores de virulência identificados entre as espécies do parasita, como também o desfecho clínico é dependente de fatores genéticos do hospedeiro (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Diferentemente do que ocorre com *L. major*, poucos modelos experimentais foram testados com *L. braziliensis*, possivelmente pelo fato desta espécie não provocar lesões em muitas linhagens de camundongos, como por exemplo, C3H/HeJ, C57BL/6J E CBA/CaJ (CHILDS et al., 2016; NEAL; HALE, 1983). Isto ocorre devido a incapacidade desta espécie em suprimir a resposta imune Th1, tornando a maioria das linhagens de camundongos resistentes à infecção (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998).

A linhagem murina mais suscetível à infecção por *L. braziliensis* é BALB/c, que apresenta um desfecho clínico semelhante ao observado em humanos, principalmente em relação a persistência do parasita, resposta imune e ulceração da lesão. A infecção subcutânea na pata de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* promove a formação de lesões pequenas e nodulares (ROCHA et al., 2007), já a infecção por via intradérmica na orelha causa úlceras semelhantes àsquelas observadas em pacientes (DE MOURA et al., 2005) e em ambos os modelos, a cura é espontânea. O primeiro trabalho que avaliou a resposta imune deste modelo observou que camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* produzem menos IL-4 comparados aos infectados com *L. major*, além disso, quando tratados com anti-IFN- γ desenvolveram lesões significativamente maiores e progressivas sem resolução (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998). Deste modo, um mecanismo dependente de IFN- γ é responsável pela eliminação do parasita *L. braziliensis* em camundongos BALB/c.

No modelo experimental de infecção desenvolvido por De Moura e colaboradores (2005), camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* por via intradérmica apresentaram diversos aspectos semelhantes à infecção natural, tais como, a disseminação do parasito para os linfonodos drenantes, a presença da ulceração na lesão e da intensa resposta imune Th1 com a produção de citocinas como IFN- γ e quimionas pro-inflamatórias (DE MOURA et al., 2005). Do mesmo modo, neste modelo foi observado também uma resposta mista Th1/Th2,

caracterizada pela presença de células T CD4⁺ secretoras de IFN- γ , IL-4 e IL-10, confirmando a ausência da dominância de resposta Th2 observada na infecção por *L. major* em animais suscetíveis (DE MOURA et al., 2005). Em humanos, o controle da infecção contra a *Leishmania* está associado à diferenciação de linfócitos T específicos produtores de IFN- γ , capazes de controlar os parasitas através da ativação de macrófagos infectados (BARRAL et al., 1995; SCOTT; NOVAIS, 2016). Já as citocinas IL-10 e TGF- β possuem um papel anti-inflamatório, contribuindo com a replicação dos parasitas nos macrófagos (BARRAL et al., 1995; BOURREAU et al., 2001; SALHI et al., 2008). Assim, tem sido mostrado que o equilíbrio entre as citocinas como IL-10 e IFN- γ é determinante para a cura das lesões, como também para a persistência do parasita (GAZE et al., 2006; GOMES-SILVA et al., 2007; SALHI et al., 2008).

Em vista disso, com a finalidade de desenvolver uma alternativa terapêutica que usufruísse de mecanismos tolerogênicos capaz de induzir uma imunomodulação, de modo que diminuísse a resposta inflamatória exacerbada causada pela infecção por *L. braziliensis*, decidimos testar o protocolo de tolerância oral após a infecção.

1.6 TOLERÂNCIA ORAL

Em 1949, Frank Burnet introduziu o conceito de “*self*” (próprio) e “*non-self*” (não-próprio). Segundo sua hipótese, o conceito de próprio é ativamente definido pelo sistema imune ainda no desenvolvimento embrionário. Posteriormente, em 1953, Peter Medawar confirmou a teoria do seu colega e a combinação dos seus trabalhos deram a origem ao conceito de tolerância imunológica (BILLINGHAM; BRENT; MEDAWAR, 1953). Este fenômeno é conhecido como sendo essencial na homeostase do corpo, visto que, a partir dele o organismo consegue tolerar autoantígenos e não reagir de forma inflamatória contra eles.

Um outro mecanismo, análogo à tolerância imunológica, é a tolerância oral (TO) sendo definida como um estado de supressão imunológica das respostas celulares e/ou humorais frente a antígenos externos que foram ingeridos previamente por via oral (FARIA; WEINER, 2005, 2006; VAZ et al., 1977). Ela é considerada um mecanismo imunológico natural, pois ocorre diariamente com as inúmeras proteínas exógenas ingeridas através da alimentação. A TO possui um papel muito importante no organismo, pois contribui para o equilíbrio entre antígenos exógenos derivados da dieta e da microbiota comensal do intestino e dos componentes próprios do corpo na superfície da mucosa intestinal.

A indução de células T regulatórias (Tregs) é um dos principais mecanismos que promovem a geração da TO, estas células são capazes de produzir citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , que atuam na supressão da resposta inflamatória (FARIA; WEINER, 2005). Além disso, as células Tregs induzidas através da administração de antígenos por via oral possuem um efeito de tolerância sistêmica, ou seja, são capazes de migrar e suprimir respostas imunes em focos inflamatórios presentes no corpo. Diversos trabalhos com diferentes antígenos-alvos de doenças autoimunes mostraram que a sua ingestão por via oral foi capaz de prevenir a doença dos modelos experimentais de encefalomielite autoimune experimental, colite, artrite, uveíte, tireoidite, entre outras (FARIA; WEINER, 2005) . Desta forma, é importante estudar os mecanismos de indução da TO, a fim de utilizá-la como alternativa terapêutica que restaurem a homeostase tecidual.

A mucosa intestinal representa a maior superfície de contato com o meio externo e é a rota primária pela qual somos expostos à antígenos diariamente (WEINER; WU, 2011). Ela consiste em uma única camada de epitélio intestinal constituído por células absorptivas formando interface entre o lúmen intestinal (externo) e a lâmina própria (interno). Deste modo, pode-se dizer que a anatomia da mucosa intestinal não foi formada para funcionar como uma barreira restrita, mas sim como interface, que permite a absorção de nutrientes e ao mesmo tempo abriga trilhões de microorganismos comensais (MUCIDA; PARK; CHEROUTRE, 2009; WEINER; WU, 2011).

O ambiente tolerogênico do intestino está relacionado principalmente ao GALT (Tecido Linfoide Associado ao Intestino). O GALT é formado pelas placas de Peyer's (PP), pelos folículos linfoides isolados e apêndice. Juntos, o GALT, os linfócitos intraepiteliais (IELs) e os linfócitos da lâmina própria (MOWAT, 2003) formam o maior órgão linfoide do corpo. Uma rede de linfonodos mesentéricos (LNm) associada ao GALT é responsável pela drenagem de vários segmentos dos intestinos delgado e grosso, atuando como um sítio de migração, maturação, diferenciação e proliferação de linfócitos ativados na mucosa intestinal após estímulo (BRANDTZAEG, 2009; ESTERHÁZY et al., 2019). Desta forma, estas estruturas são essenciais para o reconhecimento imune de antígenos no lúmen intestinal e os LNm são importantes para o desenvolvimento da TO (SPAHN et al., 2002; WORBS et al., 2006).

Vários mecanismos efetores relacionados com a indução da tolerância oral foram propostos para esclarecer a hiporesponsividade de antígenos derivados da dieta. Já foi demonstrado que baixas doses de antígenos administrados por via oral promovem a supressão da resposta através da produção de Tregs, por outro lado altas doses podem gerar anergia ou

deleção clonal de linfócitos T (CHEN et al., 1995; CHEN; WEINER, 1996; WEINER; WU, 2011).

Após a ingestão por via oral, o antígeno pode alcançar o GALT de várias formas. O antígeno pode ser capturado pelos dendritos das DCs que atravessam o epitélio e penetram o lúmen, pelas células M ou ser absorvido pelas células epiteliais intestinais. Quando administrado com baixas doses, o antígeno é capturado por DCs que possuem um perfil tolerogênico. Já está bem estabelecido que a captura e apresentação de antígenos pelas DCs presentes na lâmina própria (LP) do intestino é importante para o desenvolvimento da TO. As DCs CD103⁺ são fundamentais para a TO, por sua capacidade de produzir ácido retinóico (KELSALL, 2008), que juntamente com a citocina TGF- β , torna estas DCs capazes de induzir a diferenciação de células Tregs CD4⁺Foxp3⁺, essenciais no desenvolvimento da TO (COOMBES et al., 2007; MUCIDA; CHEROUTRE, 2007; SCOTT; AUMEUNIER; MOWAT, 2011). Após a captura do antígeno, as DCs CD103⁺ migram para o LN_m de maneira dependente de CCR7, induzem a diferenciação de células Tregs CD4⁺Foxp3⁺. As Tregs que expressam moléculas direcionadoras de migração como o receptor de quimiocina CCR9 e a integrina α 4 β 7 são capazes de migrar para a LP onde proliferam através da influência de macrófagos CX3CR1⁺ produtores de IL-10 e outras células produtoras de IL-10 e TGF- β , auxiliando no processo da tolerância oral (MAZZINI et al., 2014) (Figura 4). Os LN_m têm sido identificado como o sítio de indução da TO (WORBS et al., 2006), enquanto as PP não são necessárias no desenvolvimento da TO (KRAUS; MAYER, 2005; SPAHN et al., 2002).

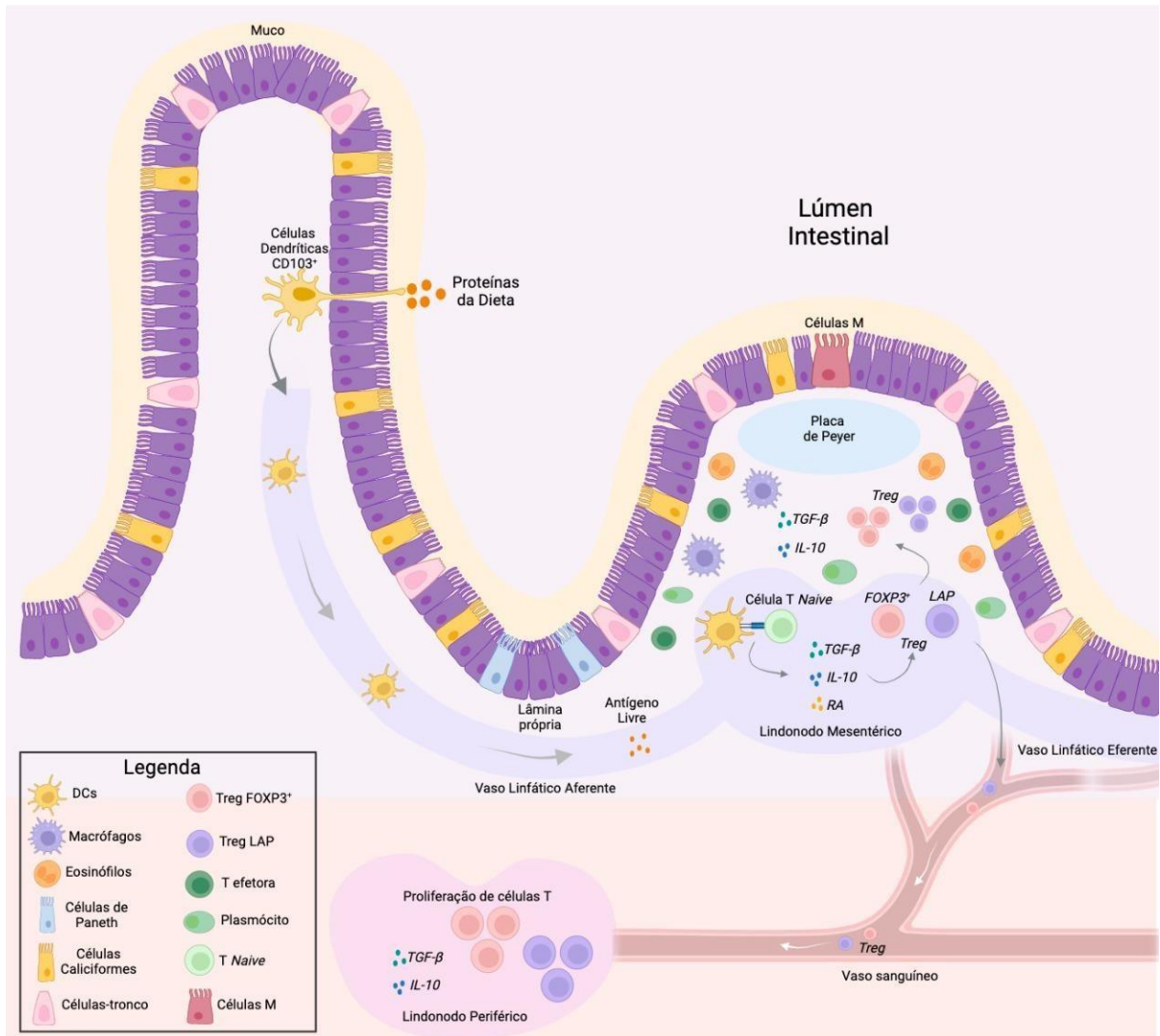


Figura 4 - Indução e manutenção da tolerância oral.

Fonte: Adaptado de (MOWAT, 2018; DELGOBO et al., 2019; BERTOLINI et al.; 2021).

A captura de antígenos no lúmen intestinal, como por exemplo, proteínas da dieta, ocorre por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo o transporte dos antígenos através das células M para as Placas de Peyer, por DCs que capturam antígenos, ou após a transferência de antígeno por macrófagos CX3CR1⁺ que captam antígenos luminiais. Neste caso, DCs CD103⁺CCR7⁺ são mais eficientes em induzir Tregs e tolerância após serem carregadas de antígeno e migrarem para LNm. DCs CD103⁺ produzem ácido retinóico (RA) e IL-10, que em combinação com TGF-β induzem a diferenciação de Treg Foxp3⁺. As DCs CD103⁺ também mediam a regulação positiva dos receptores de *homing* do intestino, CCR9 e integrina α4β7, permitindo que as Tregs recém-diferenciadas voltem para o LP, onde sofrem expansão local para induzir a tolerância oral. A produção de IL-10 por macrófagos CX3CR1⁺ residentes contribui para expandir iTregs Foxp3⁺ na LP. A presença de TGF-β por si só pode induzir a diferenciação de Treg LAP⁺.

Além disso, Tregs medeiam a supressão de respostas inflamatórias pela produção de citocinas inibitórias, como IL-10 e TGF- β . As iTregs CD4⁺Foxp3⁺ que foram geradas no LNm podem estar envolvidas nas consequências sistêmicas da tolerância oral a antígenos proteicos, e migram através do vaso linfático eferente para o ducto torácico e posteriormente para a corrente sanguínea sendo requeridas em tecidos inflamados.

Nos LNm ocorre a diferenciação de diversos subtipos de células Tregs no intestino, como: Tregs induzidas CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (iTregs), células Tr1, Tregs LAP⁺ (células Th3), Treg CD8⁺ e células T $\gamma\delta$. Entre as células Tregs CD4⁺Foxp3⁺, as Tregs naturais derivadas do timo (nTregs) são importantes na manutenção do controle da autoreatividade a componentes próprios evitando assim a formação de doenças autoimunes. O Foxp3 (*forkhead box protein 3*) é um fator de transcrição nuclear chave envolvido na geração de células nTregs. Camundongos duplo transgênicos, que possuem linfócitos T reativos à ovalbumina (OVA) e linfócitos B reativos à hemaglutinina (HA), não são capazes de produzir nTregs, mas desenvolveram TO à OVA (CUROTTO DE LAFAILLE et al., 2008). Esses camundongos duplo transgênicos OVA-HA, geneticamente deficientes de Foxp3 e, portanto, não produzem iTregs, não desenvolveram TO à OVA, indicando que as iTregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ na periferia são necessárias para a TO (CUROTTO DE LAFAILLE et al., 2008; MUCIDA et al., 2005).

Além das células iTregs clássicas, outro subtipo de Treg que estão presentes em abundância na mucosa intestinal são as células Tregs CD4⁺LAP⁺ ou Th3 dependentes de TGF- β , que expressam a molécula LAP (*latency-associated peptide*), denominado como TGF- β de membrana (OIDA; WEINER, 2010) e atuam como supressoras de maneira dependente de TGF- β (OCHI et al., 2006). 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- β -latente.

A geração de células Tregs é o produto da apresentação de antígenos orais pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) presentes na mucosa intestinal. As células Tregs induzem preferencialmente a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β e IL-4 (FANGER JOANNE L VINEY; MOWAT; O, 1998; SIMIONI et al., 2004). Em seguida, as células Tregs migram para os órgãos linfoides com o objetivo de suprimir a resposta imunológica através da liberação de citocinas anti-inflamatórias não específicas, além de inibir a geração de células efectoras FARIA; WEINER, 1999, 2005, 2006).

Em resumo, a captura de antígenos pelas DCs com perfil tolerogênico e pelos macrófagos residentes CX3CR1⁺ no GALT, a migração das DCs para os linfonodos mesentéricos e a indução de células Tregs com a presença de citocinas anti-inflamatórias

representam etapas essenciais durante a indução da TO (MAZZINI et al., 2014; PABST; BERNHARDT, 2013).

Nos últimos anos, a indução da TO já tem sido utilizada com sucesso em inúmeros modelos experimentais de doenças autoimunes como também em outras condições inflamatórias, como alergias e transplantes (FARIA; WEINER, 2005). Estes protocolos buscam um antígeno alvo específico para a indução de tolerância oral e pode ser usada como alternativa terapêutica. Por exemplo, foi demonstrado em modelos de artrite, colite, aterosclerose e diabetes que a ingestão oral de autoantígenos preveniu aspectos clínicos da doença (CHEN et al., 2016; HARATS et al., 2002). No entanto, o uso do antígeno alvo para induzir a TO pode se tornar uma possível desvantagem em doenças autoimunes ou inflamatórias, onde o antígeno alvo ainda não é conhecido.

Surpreendentemente, a tolerância oral está associada com o fenômeno de supressão cruzada (VAZ et al., 1981) ou supressão “*bystander*” (MILLER; LIDER; WEINER, 1991), no qual células iTregs pelos antígenos ingeridos pela dieta são capazes de suprimir a resposta imune estimulada por outros antígenos, devido a liberação de citocinas imunomoduladoras não específicas. Assim, para doenças inflamatórias de órgão específico, podem ser utilizados antígenos por via oral capazes de induzir células reguladoras, estas migram para o sítio alvo e suprimem a inflamação (FARIA; WEINER, 2006). No modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE), após a indução de tolerância oral devido a ingestão do antígeno da mielina, foi observado a presença de células supressoras dependentes de TGF- β e identificadas como células Tregs CD4⁺LAP⁺ do tipo Th3 (MILLER et al., 1992). Além disso, o importante papel da IL-10 no fenômeno da indução de TO foi sustentado pela observação que células Tregs do tipo Tr1 específicas a ovalbumina (OVA), prevenindo a doença em um modelo de intestino inflamado (IBD) (GROUX et al., 1997).

Outros modelos experimentais de doenças autoimunes também demonstraram a utilização do fenômeno de supressão “*bystander*”. Camundongos administrados com proteína básica de mielina (PBM) e co-imunizados com PBM e a proteína proteolípídica da mielina preveniram o desenvolvimento da EAE. Nos modelos de artrite, induzida por antígeno ou por adjuvante, a doença foi suprimida pela administração de colágeno tipo II (YOSHINO; QUATTROCCHI; WEINER, 1995). Os efeitos sistêmicos da indução da TO foram demonstrados pela administração de OVA em camundongos, nos quais a formação de granuloma e da cicatriz cutânea causada pelo helminto *Schistosoma mansoni* foram inibidas pela injeção de OVA no momento da infecção (AZEVEDO et al., 2012; CANTARUTI et al., 2017).

Além disso, diversos trabalhos têm demonstrado a utilização da bactéria *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) como uma boa ferramenta no tratamento e prevenção de modelos de doenças inflamatórias, como EAE, colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS – *Dextran Sulfate Sodium*) e artrite induzida por antígeno, com a geração de células Tregs induzidas que são capazes de inibir efeitos inflamatórios (GOMES-SANTOS et al., 2017; GUSMAO-SILVA et al., 2020; REZENDE et al., 2013).

Desta forma, as bactérias *L. lactis* seriam uma potente alternativa de veículo para induzir efeitos imunoregulatórios, liberando aos poucos o antígeno administrado por via oral no intestino, promovendo a diferenciação de células Tregs capazes de mitigar os efeitos inflamatórios de doenças crônicas, como na LC causada por *L. braziliensis*.

1.7 AS BACTÉRIAS LÁCTICAS E *LACTOCOCCUS LACTIS*

As bactérias lácticas (BL) são amplamente conhecidas no campo da indústria alimentícia, principalmente pelo seu uso na produção e preservação de produtos fermentados, como por exemplo laticínios em geral (CAVANAGH; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2015). As bactérias lácticas são produtoras de ácido láctico, resultado da fermentação de carboidratos.

Estas bactérias constituem um grupo heterólogo de microorganismos, considerados como Gram-positivos, sem esporulação e primariamente anaeróbicos. O seu uso tradicional na indústria de alimentos constata a ausência de patogenicidade, e foram classificadas e reconhecidas como “*generally regarded as safe*” (GRAS) pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos (DONOHUE; GUEIMONDE, 2011; PAHO/WHO, 2002).

As principais espécies que compreendem o grupo das bactérias lácticas são dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus*, *Streptococcus* e *Lactococcus*, entre outras (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Além do uso e vantagens para a indústria de alimentos, as BL vêm sendo utilizadas como suplementos alimentares probióticos devido a seus efeitos benéficos à saúde (GASBARRINI; BONVICINI; GRAMENZI, 2016). De acordo com a OMS, probióticos são definidos como microorganismos, que quando administrados em quantidades apropriadas, trazem benefícios à saúde (FAHO/WHO, 2002; GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

Muitas BL têm sido estudadas como probióticas por apresentarem efeitos anti-inflamatórios, como por exemplo, algumas do tipo *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (ISHIDA et al., 2005). Desta maneira, os probióticos possuem um papel importante na saúde como um todo e na prevenção de infecções (JOHNSON; KLAENHAMMER, 2014; REID et al., 2003),

uma vez que, os metabólitos produzidos pela fermentação das BL fornecem um equilíbrio no crescimento de bactérias patogênicas e benéficas do intestino, auxiliando na homeostase da microbiota envolvida (ISHIDA et al., 2005).

Pouco tempo atrás, uma nova aplicação começou a ser empregada para as bactérias lácticas, seu uso como vetores vivos para antígenos, proteínas terapêuticas ou entrega de DNA em superfícies de mucosa (MIYOSHI et al., 2004). Deste então, diversos trabalhos vêm sendo realizados com esta tecnologia e dentre as principais espécies de BL utilizadas como vetores estão: *Lactobacillus spp.* e *Lactococcus spp.* A espécie *L. lactis* é a mais caracterizada do gênero, devido ao fato de ter sido a primeira bactéria láctica com o genoma completamente sequenciado. As *L. lactis* são bactérias de fácil manipulação genética, gram-positivas, não produzem endotoxinas, LPS ou qualquer outro metabólito tóxico (BOLOTIN et al., 2001; DE MORENO DE LEBLANC et al., 2015). Em virtude do desenvolvimento de diversas tecnologias genéticas, esta espécie é uma das bactérias mais amplamente utilizada no campo industrial de laticínios e isso contribuiu para seu reconhecimento como GRAS. Embora não sejam residentes naturais da microbiota intestinal, as *L. lactis* conseguem sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal (CAVANAGH; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2015; WEGMANN et al., 2007).

Nos últimos anos, trabalhos vêm demonstrando a utilização desta BL como um organismo geneticamente modificado (OGM), capazes de carregar materiais de interesse como DNA e proteínas na mucosa intestinal (DE MORENO DE LEBLANC et al., 2015). Um dos pioneiros, Steidler e colaboradores (1998, 2000) evidenciaram que a cepa de *L. lactis* construída geneticamente para secretar a citocina IL-10, quando administrada por via oral, foi capaz de prevenir a colite em camundongos deficientes de IL-10. O grupo de Faria e colaboradores (1998, 2003) mostrou em diversos modelos experimentais que a maneira mais eficaz de induzir a tolerância oral é através da ingestão contínua de proteínas.

Desta forma, com o objetivo de mimetizar os efeitos da ingestão contínua, empregou-se o uso de bactérias lácticas geneticamente modificadas produtoras de proteínas heterólogas. Assim, a sensibilização com a bactéria *L. lactis* geneticamente construída para produzir e secretar OVA foi capaz de induzir o aumento da produção de IL-10, por células iTregs específicas à OVA no GALT e no baço, no modelo de camundongos transgênicos DO11.10 após desafio com injeções de OVA (HUIBREGTSE et al., 2007; MAILLARD; SNAPPER, 2007). Do mesmo modo, no grupo de Faria e colaboradores observou-se diversos efeitos anti-inflamatórios com o uso da *L. lactis* produtora de Hsp65 em modelos experimentais de doenças

autoimunes e inflamatórias (GOMES-SANTOS et al., 2017; GUSMAO-SILVA et al., 2020; REZENDE et al., 2013).

1.8 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs)

As proteínas de choque térmico, ou *Heat Shock Proteins* (Hsps), são denominadas como um grupo de proteínas funcionais das células de todos os organismos vivos, da bactéria ao ser humano. Predominantemente, estão presentes no citosol, na mitocôndria e no retículo endoplasmático das células (GULLO; TEOH, 2004). Células que sofrem estresse pela exposição a altas temperaturas, toxinas, condições oxidativas e privação de glicose aumentam sua expressão de Hsps (DE MAIO, 1999; GALLO et al., 2011). Em condições normais, as Hsps também são encontradas em baixas quantidades e possuem um papel essencial no funcionamento da célula (ELLIS, 1990; LINDQUIST; CRAIG, 1988). As Hsps atuam na manutenção da homeostase celular, servindo principalmente como “chaperonas”, moléculas que acompanham e estabilizam outras proteínas em estágios intermediários de dobramento, montagem e translocação através de membranas, bem como durante o processo de degradação (BUKAU; HORWICH, 1998). Além disso, as “chaperonas” intracelulares, como são conhecidas, atuam na reciclagem de proteínas da célula e participam das vias de sinalização da sobrevivência celular (BORGES; RAMOS, 2005; MARTIN; HARTL, 1993; STETLER et al., 2010).

As proteínas de choque térmico (Hsps) são classificadas em famílias, cujos membros são denominados de acordo com seu peso molecular em kilodaltons (kDa). As mais estudadas são Hsp60, Hsp70 e Hsp90 (ELLIS, 1990). Estas proteínas são muito bem conservadas filogeneticamente, e por isso, são bastante homólogas entre as espécies. Por exemplo, a Hsp60 humana e bacteriana pode apresentar homologia de até 50% entre sequências de aminoácidos (JINDAL et al., 1989).

Diversos trabalhos já demonstraram que as Hsps possuem um papel importante na imunopatologia de doenças autoimunes (ANDROVITSANEA et al., 2021; SAMBORSKI; GRZYMISŁAWSKI, 2015; TUKAJ; KAMINSKI, 2019). Deste mesmo modo, apesar de serem reconhecidas geralmente como proteínas citosólicas, as Hsps podem ser secretadas ou estarem presentes nas membranas e assim são capazes de interagir com células do sistema imunológico mediando respostas imunes (SCHMITT et al., 2007). Estudos têm mostrado que Hsps, como Hsp60, exercem importantes funções na apresentação de antígeno, ativação de linfócitos e macrófagos e na maturação e ativação de DCs (SRIVASTAVA, 2002; WALLIN et al., 2002).

As Hsps podem ativar o sistema imune através de diversos receptores de superfície, como receptor do tipo Toll 2 (TLR2), receptor do tipo Toll 4 (TLR4), CD14, CD91 e CD40 (BINDER; SRIVASTAVA, 2004).

As formas que a Hsp60 pode interagir com o sistema imune já estão bem estabelecidas, são elas: (1) como ligante de receptores da imunidade inata, como os receptores TLR2 (ZANIN-ZHOROV et al., 2006), promovendo a inibição do recrutamento de células T e, por consequência, diminuindo a entrada destas células no sítio inflamatório (ZANIN-ZHOROV et al., 2003, 2005); e (2) como autoantígeno sendo reconhecido por receptores da imunidade adaptativa (QUINTANA et al., 2008). Foi demonstrado que, após a ligação com o TLR2, a Hsp60 induz o aumento da produção de IL-10 e reduz a produção de IFN- γ e TNF- α pelas células T (ZANIN-ZHOROV et al., 2003, 2005). Além disso, foi observado que a Hsp60 é importante para a sobrevivência e função de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, como também, promoveram a diferenciação de células CD4⁺CD25⁻ em células Tregs CD4⁺CD25^{high} derivadas de pacientes com artrite idiopática juvenil (JIA) (DE KLEER et al., 2004; VAN EDEN; VAN DER ZEE; PRAKKEN, 2005).

Diversos trabalhos também demonstraram que a administração por via oral da Hsp65 derivada do *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que possui similaridades a Hsp60 humana, foi capaz de induzir a tolerância oral e forneceu proteção contra aterosclerose em camundongos e artrite induzida por adjuvante em ratos (COBELENS et al., 2002; HARATS et al., 2002; MARON et al., 2002).

Diante disso, as Hsps representam potencial como candidatas promissoras de antígenos não específicos, capazes de induzir a diferenciação de células T regulatórias, tornando-se uma alternativa relevante para o uso terapêutico da tolerância oral em doenças inflamatórias e autoimunes (GOMES-SANTOS et al., 2017; GUERRA et al., 2021; GUSMAO-SILVA et al., 2020; JING et al., 2011; REZENDE et al., 2013).

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é um conjunto de doenças negligenciadas, considerada como uma das maiores causas de doenças infecciosas no mundo. A LC é a sua forma clínica mais comum, caracterizada pela formação de lesões com bordas elevadas e fundo necrótico, ocorrendo em algumas ocasiões lesões desfigurantes e estigmatizantes. Há uma resposta inflamatória intensa, porém com poucos parasitas presentes na lesão. Apesar da presença de citocinas inflamatórias ser essencial na destruição do parasita, sua produção exacerbada e sem regulação, provoca a formação da lesão. Em vista disso, faz-se necessário buscar o equilíbrio entre o processo inflamatório e a regulação da resposta imune para destruir o parasita e diminuir o ambiente inflamatório causado pela infecção. Nesse sentido, as células Tregs e citocinas imunomodulatórias, atuam como principais protagonistas na supressão de efeitos inflamatórios.

Nos últimos anos, a TO vem sendo utilizada de forma promissora em diversos modelos experimentais de doenças autoimunes, como EAE, artrite e diabetes, e em doenças inflamatórias tais como colites e alergias. A indução da TO promove a supressão da resposta inflamatória através da ação de células Tregs como $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ e $CD4^+LAP^+$, que secretam citocinas imunomodulatórias como IL-10 e TGF- β (FARIA; WEINER, 2005). Visto que, as Hsps possuem uma participação importante na regulação do sistema imune, tanto na geração de células Tregs quanto na produção de citocinas anti-inflamatórias, estas proteínas tornam-se candidatas promissoras na indução de mecanismos imunoreguladores para alternativa terapêutica de doenças autoimunes e anti-inflamatórias.

Neste contexto, inúmeros estudos demonstraram que a administração por via oral de *L. lactis* recombinantes produtores de Hsp65 derivada do *M. leprae* promoveu a prevenção em diferentes modelos experimentais de doenças autoimunes e inflamatórias, através da indução de TO (GOMES-SANTOS et al., 2017; GUSMAO-SILVA et al., 2020; JING et al., 2011; REZENDE et al., 2013). Recentemente, o nosso grupo desenvolveu o primeiro trabalho que mostrou o uso da TO induzida pela administração prévia de *L. lactis* produtor de Hsp65 em um modelo de LC em camundongos (GUERRA et al., 2021). Este estudo serve como uma prova de conceito que demonstra a possibilidade de modular a resposta inflamatória causada por *L. Braziliensis*, utilizando tolerância oral induzida por *L. lactis* recombinante.

Diante disso, com o objetivo de desenvolver uma alternativa terapêutica que induzisse efeitos imunomodulatórios através da indução de TO e diminuísse os efeitos inflamatórios causados pela infecção por *L. braziliensis*, no presente trabalho utilizamos a tecnologia de entrega da Hsp65 derivada da *M. leprae* carreada pela cepa de *L. lactis* recombinante

diretamente na mucosa intestinal, desenvolvido por Myoshi e colaboradores em 2004 (UFMG) e cedido pelo grupo de Faria e colaboradores (UFMG).

2.1 HIPÓTESE

A tolerância oral induzida pela administração de *Lactococcus lactis* recombinante produtora da proteína Hsp65 obtida de *Mycobacterium leprae* após a infecção modula a inflamação causada por *Leishmania braziliensis* sem interferir na imunidade antiparasitária.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico da administração oral de *L. lactis* produtora de Hsp65, como tratamento imunomodulador em modelo experimental de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c.

2.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se o tratamento oral com *L. lactis* expressando Hsp65, administrado 4 semanas após a infecção, diminui a inflamação causada pela infecção por *L. braziliensis* no tamanho e na carga parasitária da lesão em camundongos BALB/c.
- Avaliar se o tratamento oral com *L. lactis* produtora de Hsp65 após a infecção por *L. braziliensis* interfere:
 - Na produção de citocinas inflamatórias e imunomodulatórias pelos linfonodos drenantes da lesão;
 - Na expressão de células Tregs envolvidas na indução de tolerância oral nos linfonodos drenantes da lesão;
 - Na inflamação causada pela infecção por *L. braziliensis*.

3 DESENHO EXPERIMENTAL

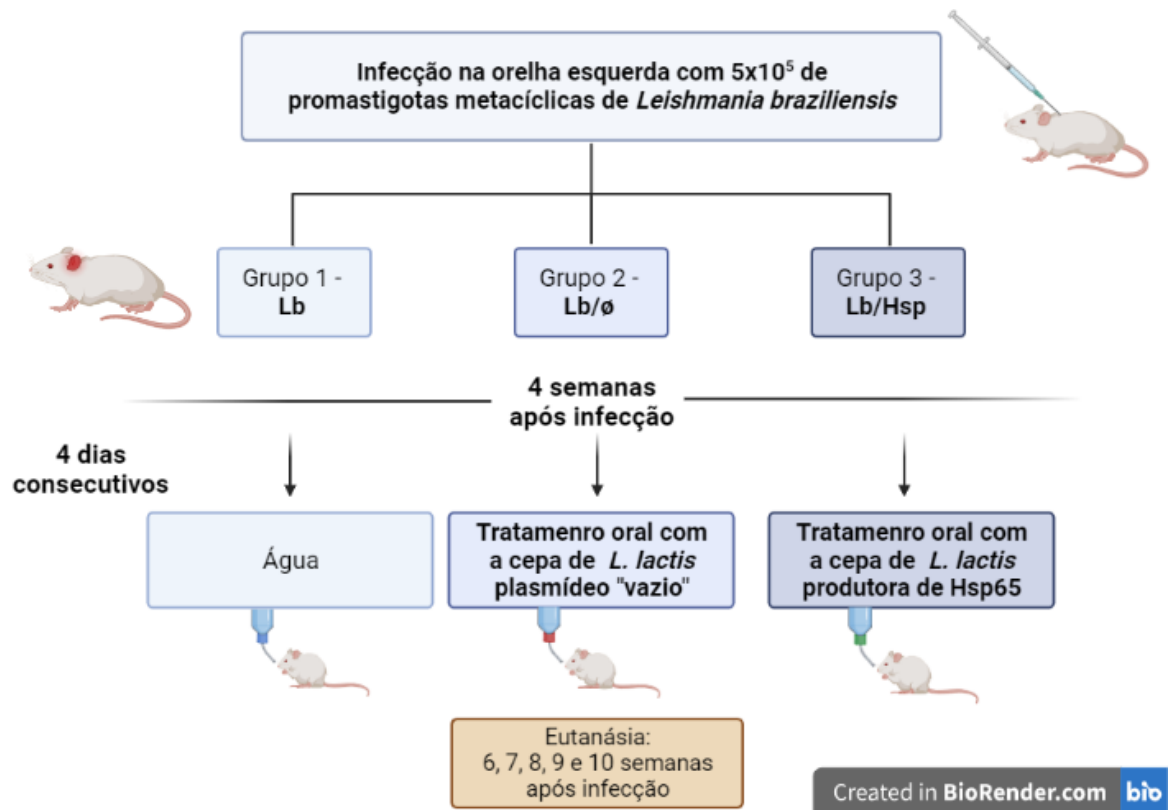


Figura 5 - Desenho experimental dos estudos *in vivo*.

Fonte: Elaborado pela autora

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

De acordo com a submissão e aprovação do projeto no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz-BA), protocolo CEUA N° 003/2019, foram utilizados camundongos fêmeas da espécie *Mus Musculus* linhagem BALB/c, com 6 a 8 semanas da idade neste estudo. Para os experimentos in vivo, foram utilizados 180 animais, sendo 5 a 10 animais por experimento com n° 3 de repetições. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz/Bahia), onde foram mantidos à temperatura ambiente, com ração comercial apropriada e água *ad libitum* em microisoladores apropriados para criação.

4.2 PARASITAS

Os parasitas da espécie *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/01/BA788) utilizados neste estudo foram cultivados em meio Schneider (Sigma, EUA) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (Gibco, EUA), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) a 24 °C por aproximadamente 5 dias até que atingissem a fase estacionária de crescimento (promastigotas metacíclicas). O crescimento da cultura foi acompanhado através da contagem de números de parasitas por mL utilizando a câmara de Neubauer, observando-se o crescimento exponencial até a fase estacionária. Para garantir a virulência nos experimentos de infecção em animais, foram utilizados parasitas até a 5ª passagem.

4.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Ao chegar à fase estacionária, os parasitas em sua forma promastigota metacíclica foram submetidos ao método de purificação mediado pela aglutinação de lectina (*Bauhinia purpure*) como descrito em trabalho prévio (PINTO-DA-SILVA et al., 2002). Assim, foram obtidas promastigotas metacíclicas com populações mais homogêneas, tornando a infecção experimental mais próxima da condição de infecção natural. Os animais foram, então, desafiados na orelha esquerda por via intradérmica (i.d) utilizando seringa com agulha fixa 30G

de 1 mL, com uma concentração de 5×10^5 de parasitas promastigotas metacíclicas purificadas de *L. braziliensis* com o volume final por animal de 10 μ L de salina 0,9% estéril. A espessura das lesões na orelha foi mensurada semanalmente, utilizando um paquímetro digital (Thomas Scientific, EUA).

4.4 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS E ACONDICIONAMENTO MICROBIOLÓGICO

As linhagens da bactéria *L. lactis* utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 1. O meio de cultivo utilizado para o crescimento da bactéria foi M17 (Difco, EUA), suplementado com 0,5% de glicose (Merck) ou 1% de xilose (Sigma-Aldrich) (GM17 ou XM17, respectivamente). Para o cultivo das bactérias, 10 μ g/mL do antibiótico cloranfenicol (Sigma) foi adicionado aos meios GM17 ou XM17. As bactérias foram crescidas a 30°C sem agitação. Para fins de armazenamento, as linhagens de *L. lactis* foram cultivadas como descrito anteriormente e, em seguida, foram diluídas (4:1) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas no freezer -80°C.

Tabela 1 - Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

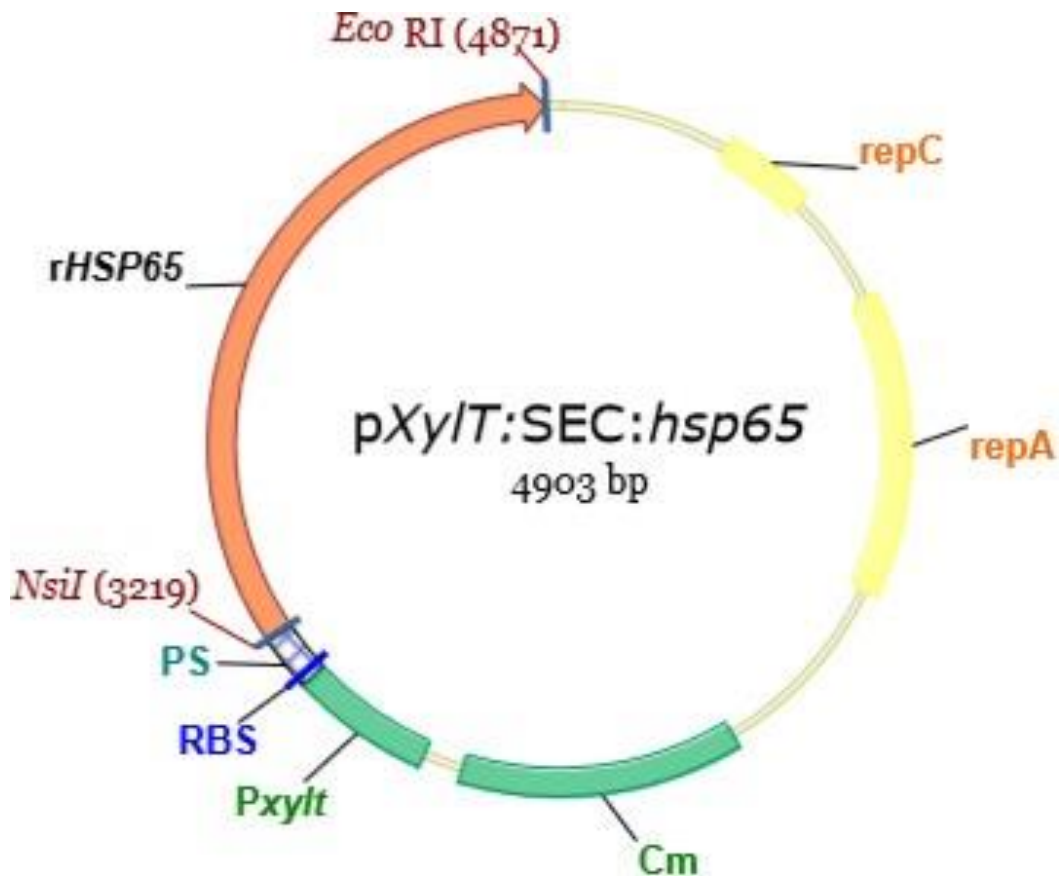
Espécie bacteriana	Linhagem utilizada	Fonte
<i>L. lactis</i> NCDO2118	<i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> selvagem	Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais
<i>L. lactis</i> pSEC: HSP65	<i>L. lactis</i> NCDO2118 portadora do vetor de expressão pXyIT:SEC:HSP65/Cmr com a sequência codificadora do peptídeo sinal da proteína Usp45 (SPUsp) de <i>L. lactis</i> fusionada à ORF HSP65 de <i>M. leprae</i> sob o controle do promotor PxyIT	Rocha, 2007

Fonte: Elaborado pela autora

A representação dos vetores de expressão de *L. lactis* produtor de Hsp65 está ilustrado na Figura 6. Para confirmar a expressão de Hsp65 recombinante produzida por *L. lactis*, foi estimado que *L. lactis* pSEC (produtor de Hsp na forma secretada) produz 7 mg/L de Hsp65

(MYOSHI et al., 2004). Além disso, a Hsp65 produzida por *L. lactis* é livre de LPS. Os detalhes do preparo das soluções e meios de cultura citados segue abaixo:

- **Glicose (40% p/v):** 40g de Glicose (Merck) foram dissolvidas em uma quantidade suficiente para 100 mL de água pura. Em uma capela de fluxo laminar para condições de esterilidade, a solução foi filtrada utilizando filtro de 0,22 µm (Corning), alíquotada e posteriormente acondicionada a 4°C.
- **Xilose (25% p/v):** 25 g de Xilose foram dissolvidas em 100 mL de água ultrapura. Em uma capela de fluxo laminar para condições de esterilidade, a solução foi filtrada utilizando filtro de 0,22 µm (Corning), alíquotada e prontamente acondicionada a -20°C.
- **Cloranfenicol (10µg/mL):** 100 mg de cloranfenicol (Sigma) foram dissolvidos em 10 mL de álcool etílico PA (Merck). Em uma capela de fluxo laminar para condições de esterilidade, a solução foi filtrada utilizando filtro de 0,22 µm (Corning), alíquotada e em seguida acondicionada a -20°C.
- **Meio 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. Posteriormente o meio foi autoclavado durante 15 minutos a 120°C.
- **Meio + Glicose (GM17):** Meio M17 com adição de 0,5% de Glicose estéril.
- **Meio + Xilose (XM17):** Meio M17 com adição de 1% de Xilose estéril.
- **Glicerol (80%):** 80 mL de glicerol foram dissolvidos em 100 mL de água pura. Em seguida a solução foi autoclavada a 120°C por 15 minutos, alíquotada, e armazenada a 4°C.



Cm^r: Resistência ao antibiótico cloranfenicol

ORF: Sequência de leitura aberta – do inglês “*Open Reading frame*”

Figura 6 - 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).

4.5 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA CEPA *LACTOCOCCUS LACTIS* RECOMBINANTE

Para a indução da expressão da proteína de interesse pela bactéria são necessários dois processos consecutivos e dependentes que correspondem ao preparo do (1) inóculo, para estimular a proliferação bacteriana e (2) o induzido, no qual ocorre a indução da expressão da proteína de interesse pela bactéria geneticamente modificada pelo sistema de expressão induzida por xilose (XIES) (MYOSHI et al., 2004).

- **Dia 1 (Inóculo):** Uma única cultura isolada de cada uma das linhagens da bactéria *L. lactis*: expressando a proteína Hsp65 recombinante (*L. lactis* pSEC:HSP65) e da bactéria contendo o plasmídeo vazio (*L. lactis* NCDO2118), sem a presença do gene que expressa a proteína Hsp65 (10 µL) foram inseridas individualmente em 5 mL de meio GM17 suplementando com cloranfenicol na concentração de 10 mg/mL. Os

inóculos são mantidos na estufa 30°C por 24 horas, sem agitação. O preparado dos inóculos sempre ocorreu no horário entre 16 e 18:00 horas em condições de esterilidade.

- **Dia 2 (Induzido):** As culturas isoladas crescidas durante a noite, contendo as linhagens da bactéria *L. lactis* NCDO2118 e *L. lactis* pSEC:HSP65 foram diluídas (1:10.0000) em meio GM17 (controle negativo da indução) e em meio XM17 (meio GM17 acrescido com xilose) em volume determinado em função da quantidade de animais a serem tratados, sabendo-se que cada animal ingere em média 5 mL de líquido por dia (7 mg/mL de Hsp65). Posteriormente, os induzidos foram incubados na estufa a 30°C por mais 18 horas, sem agitação. A indução também foi realizada sempre no horário entre 16 e 18:00 horas em condições de esterilidade.
- **Dia 3-6 (Administração do tratamento oral):** Após 4 semanas de infecção, o acesso a água foi interrompido durante 4 dias e foi disponibilizado aos animais, para beber, apenas o meio GM17 inoculado com *L. lactis* portador do plasmídeo vazio ou meio XM17 inoculado com *L. lactis* produtora de Hsp65 derivada do *M. leprae* após a etapa de indução.

4.6ADMINISTRAÇÃO POR VIA ORAL DO TRATAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Camundongos BALB/c fêmeas após 4 semanas de infecção causada por *L. braziliensis* foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais distintos. Os animais receberam por via oral água ou as diferentes culturas das bactérias de *L. lactis* considerando-se que a média de consumo líquido é em torno de 5 mL/dia por animal. A administração por via oral do tratamento com *L. lactis* produtor ou não de Hps65 foi realizado durante 4 dias consecutivos utilizando mamadeiras estéreis trocadas a cada 24 horas, seguindo o protocolo já estabelecido em Gomes-Santos et al. (2017), Rezende et al. (2013), Gusmão et al. (2020) e Guerra et al. (2021).

Os experimentos foram repetidos 3 vezes, sendo que em cada um deles, os animais foram distribuídos em 3 grupos de 5 a 10 animais cada, conforme detalhado abaixo:

- **Grupo Lb:** Camundongos BALB/c fêmeas infectados com *L. braziliensis* que receberam apenas água durante a administração por via oral do tratamento com *L. lactis* recombinante.

- **Grupo Lb/Ø (Vazio):** Camundongos BALB/c fêmeas infectados com *L. braziliensis* administrados com a bactéria *L. lactis* com o plasmídeo vazio após 4 semanas de infecção.
- **Grupo Lb/Hsp:** Camundongos BALB/c fêmeas infectados com *L. braziliensis* administrados com a bactéria *L. lactis* produtora da proteína recombinante Hsp65 após 4 semanas de infecção.

4.7 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

Os animais foram submetidos a eutanásia após 6, 7, 8, 9 e 10 semanas de infecção para a coleta das orelhas infectadas e dos linfonodos drenantes da lesão. Os órgãos foram removidos com o auxílio de materiais cirúrgicos estéreis previamente autoclavados.

Após a remoção em condições de esterilidade, os órgãos foram macerados em 1 mL de RPMI suplementado [10% de soro bovino fetal + estreptomicina (100 mg/mL)] manejando com uma peneira celular (“*cell strainer*”) com o tamanho de 40µm e o fundo do êmbolo da seringa (3 ou 5 mL) e posteriormente centrifugados a 1500 rpm, a 4°C por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 1 mL de RPMI suplementado com HEPES e diluído de forma seriada em uma placa de 96 poços fundo chato contendo meio Schneider completo [10% de soro bovino fetal + estreptomicina (100 mg/mL)]. As placas foram vedadas e incubadas a 24°C durante 15 dias.

A determinação da carga parasitária foi realizada pelo ensaio de diluição limitante descrito previamente em Belkaid et al. (1996, 2000 e 2002). A análise foi feita pela observação dos poços através do microscópio óptico invertido com aumento 20X (Nikkon) para apontar as diluições que possuíam parasitas.

4.8 CULTURA DE CÉLULAS

As culturas foram realizadas com as células obtidas dos linfonodos drenantes da lesão dos animais infectados tratados ou não. Os animais foram eutanasiados em 6, 7, 8, 9 e 10 semanas após infecção e os linfonodos foram coletados, macerados em 1 mL de RPMI completo utilizando um “*cell strainer*” (40 µm) e, posteriormente, centrifugados a 1500 rpm a 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de RPMI suplementado com HEPES (25 mM) (Sigma, St. Louis, Missouri).

A concentração celular foi determinada pelo método de exclusão utilizando azul de trypan (10 μ L suspensão de células + 45 μ L trypan + 45 μ L salina) e a contagem das células foi feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer no microscópio óptico. Após a contagem, as células foram ajustadas para a concentração de 1×10^6 células por mL em RPMI suplementado e adicionadas em placas de fundo chato (96 poços).

As células foram cultivadas em três diferentes condições: (1) sem nenhum estímulo, apenas em meio RPMI suplementado (controle negativo); (2) adicionado 5 μ g/mL de Conavalina A (Sigma-Aldrich, EUA) (controle positivo) e (3) re-estímulo com promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* na concentração de 5×10^6 parasitas/mL (proporção de 5 parasitas: 1 célula). Após 48 ou 72 horas de incubação na estufa a 37°C, 5% CO₂, os sobrenadantes das culturas foram coletados após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C e armazenados (-20°C) para dosagem de citocinas por ELISA.

4.9 DOSAGEM DE CITOCINAS PRO E ANTI-INFLAMATÓRIAS

Os níveis das citocinas IL-10, IFN- γ , TGF- β e IL-4 foram mensurados através do ensaio de ELISA dos sobrenadantes das culturas de células obtidas dos linfonodos drenantes da lesão. Para isso, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-IL10 (BD), anti-IFN- γ (BD), anti-TGF- β (Invitrogen) e anti-IL-4 (BD) murinos, de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente as placas de 96 poços de fundo chato (Nunc) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-citocina na concentração determinada pelo kit. Após o período de incubação (*overnight*) a 4° C, os poços sensibilizados foram lavados com PBS contendo 0,05% de Tween 20. Prontamente, os sítios de união inespecífica foram bloqueados com o diluente determinado pelo kit (PBS 1X + 10% SBF) por 1 hora à temperatura ambiente (TA). Após lavagem, as amostras e os padrões foram adicionados aos respectivos poços e incubados por 2 horas à TA.

Para o teste de TGF- β , as amostras foram ativadas com a acidificação (HCl 1M) seguida da neutralização (NaOH 5M) em placas separadas, como descrito pelo fabricante. Após lavagem, o anticorpo de detecção conjugado com a enzima estreptavidina foi adicionado aos poços e a placa foi incubada por mais 1 hora à TA. No caso do TGF- β , a enzima estreptavidina foi incubada por 1 hora à TA após o anticorpo de detecção, seguindo o protocolo do fabricante do kit. Em seguida, após a última lavagem, a placa foi incubada com o substrato 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 450 nm em leitor de ELISA (Molecular DevicesCorp, EUA).

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Softmax PRO (Molecular Devices, EUA). As faixas de detecção de cada citocina foram 32-4000 pg/mL para IL-10; 15-2000 pg/mL para IFN- γ ; 8-1000 pg/mL para TGF- β e 4-500 pg/mL para IL-4.

4.10 ANÁLISE DA CITOMETRIA DE FLUXO E ESTRATÉGIA DE GATING

Para a marcação superficial, as culturas das células derivadas dos linfonodos drenantes (1×10^6 células/poço) foram lavadas com 100 μ L/poço de Tampão FACS (PBS + 1% de SBF) e centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram marcadas com o mix de anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos: anti-CD4 (RM4-4), anti-CD25 (PC61.5), anti-LAP (TW7-16B4) e o anticorpo de viabilidade celular (*Live/Dead*) e incubadas por 30 minutos a 4° C no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas, permeabilizadas e fixadas com Cytotfix/Cytoperm (BD) durante 20 minutos.

Para a marcação intracelular, as células foram marcadas com o anticorpo anti-Foxp3 (FJK-16s) durante 1 hora a 4°C, protegido da luz. Os anticorpos com seus respectivos fluórocromos e suas marcações estão listados abaixo na Tabela 2.

Tabela 2 - Lista de anticorpos utilizados na citometria de fluxo, com seus respectivos marcados, fluórocromos e seus fabricantes.

Marcador	Fluórocromos	Fabricante
Anti-mouse Fixable viability	APC-Cy7	eBioscience
Anti-mouse CD4 Clone: RM4-4	Percp5.5	eBioscience
Anti-mouse CD25 Clone: PC61.5	eFluor450	Invitrogen
Anti-mouse LAP Clone: TW7-16B4	PE-Cy7	Invitrogen
Anti-mouse Foxp3 Clone: FJK-16s	PE	Invitrogen

Fonte: Elaborado pela autora

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 outros marcadores (LAP⁺, CD25⁺, Foxp3⁺) foi determinada dentro da população

CD4⁺ (região duplo positiva). Os *Dot plots* representativos das estratégias de *gating* da análise estão ilustrados a seguir (Figura 7).

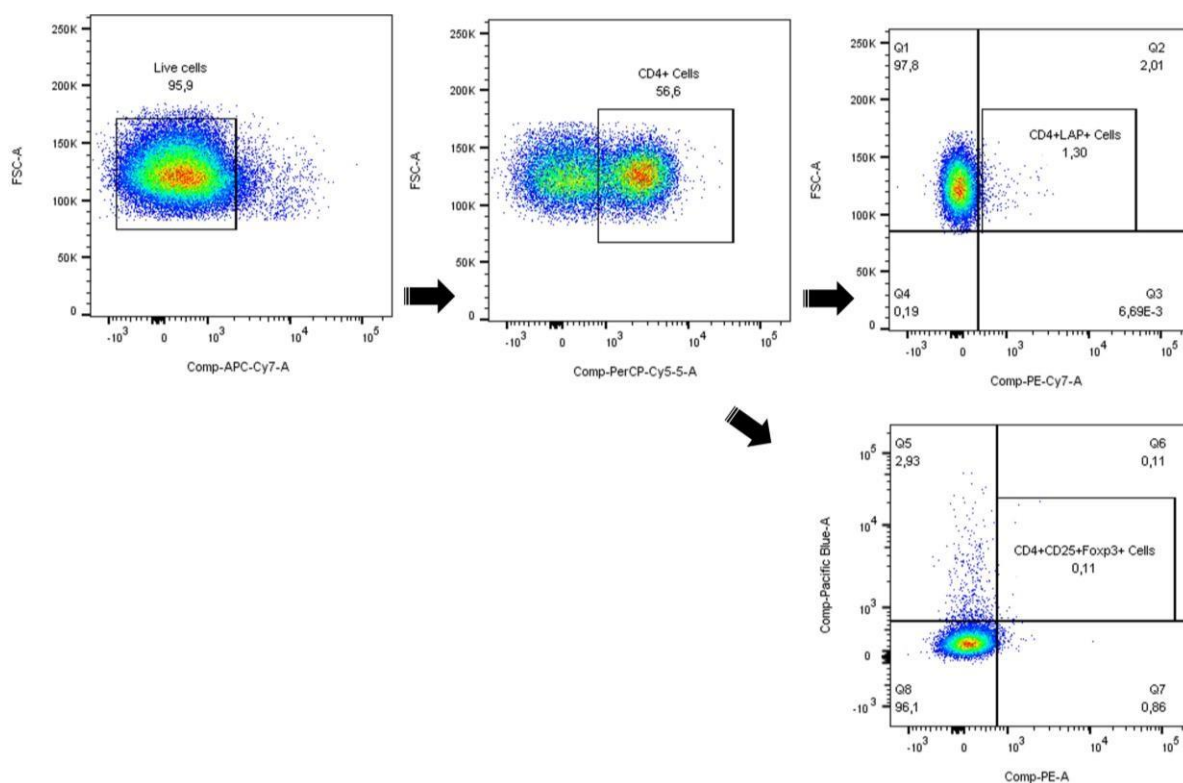


Figura 7 - *Dot plots* das estratégias de *gating* para a análise das populações de células T regulatórias por citometria de fluxo.

Fonte: Elaborado pela autora

4.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES

As orelhas infectadas foram removidas após a eutanásia dos animais nos tempos de 6, 7, 8, 9 e 10 semanas após infecção. Após fixação em paraformaldeído, as amostras foram processadas e embebidas em parafina para a confecção de cortes histológicos com secções de 5 μ m 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), 1 (presença de 1-25%), 2 (presença de 25-50%) e 3 (>50%).

A análise dos parâmetros histopatológicos foi feita levando-se em conta os escores de cada animal. Vale ressaltar que, os escores dos parâmetros analisados de cada animal foi corrigido em relação aos respectivos escores da intensidade da inflamação (por exemplo: Escore da presença de macrófagos X Escore da intensidade de inflamação = Escore da presença de macrófagos corrigido). Orelhas de animais sadios foram utilizadas como controle negativo.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nossos dados foram submetidos ao teste de normalidade D'Agostino-Pearson para verificar a distribuição dos dados. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism v.8 (San Diego, CA, EUA). Para comparar dados paramétricos entre grupos, One-Way, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey, enquanto Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn foi empregado para dados não paramétricos.

A carga da doença foi calculada como a área sob as curvas (AUC). AUC foi calculada usando dados da mensuração da espessura da orelha e carga parasitária em cada grupo. Os valores de AUC foram então comparados usando Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunns. Os resultados foram apresentados como médias \pm desvio padrão (DP) ou medianas e intervalo interquartil (IQ). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS POR VIA ORAL COM *L. LACTIS* PRODUTOR DE HSP65 APÓS A INFECÇÃO POR *L. BRAZILIENSIS*

Com o propósito de avaliar os potenciais efeitos imunomodulatórios do tratamento por via oral com *L. lactis* produtor de Hsp65 no desenvolvimento das lesões causadas pela infecção por *L. braziliensis*, a espessura da lesão foi mensurada semanalmente com auxílio de um paquímetro analógico. Ao longo da infecção, os animais desenvolveram lesões semelhantes à uma infecção natural, caracterizada pela formação de uma lesão única, bem limitada, ulcerada com bordas elevadas e fundo necrótico. Na quarta semana após a infecção, foi realizada a administração por via oral de *L. lactis* produtor de Hsp65, quando ocorreu o início da formação das lesões no sítio de inoculação em todos os animais dos grupos experimentais. A partir da décima semana, as lesões regrediram gradualmente e curaram espontaneamente até a décima segunda semana.

Os animais do grupo Lb/Hsp, que foram administrados com *L. lactis* produtor de Hsp65, desenvolveram lesões menores por todo o período após o tratamento. Nos pontos de 5, 8, 9 e 10 semanas pós-infecção, os animais tratados com Hsp65 apresentaram lesões significativamente menores comparados com os outros grupos (Figura 8A). Além disso, esta redução significativa foi observada também na área sob a curva (AUC) da espessura da lesão do grupo Lb/Hsp em comparação aos grupos controles Lb e Lb/Ø (Figura 8B).

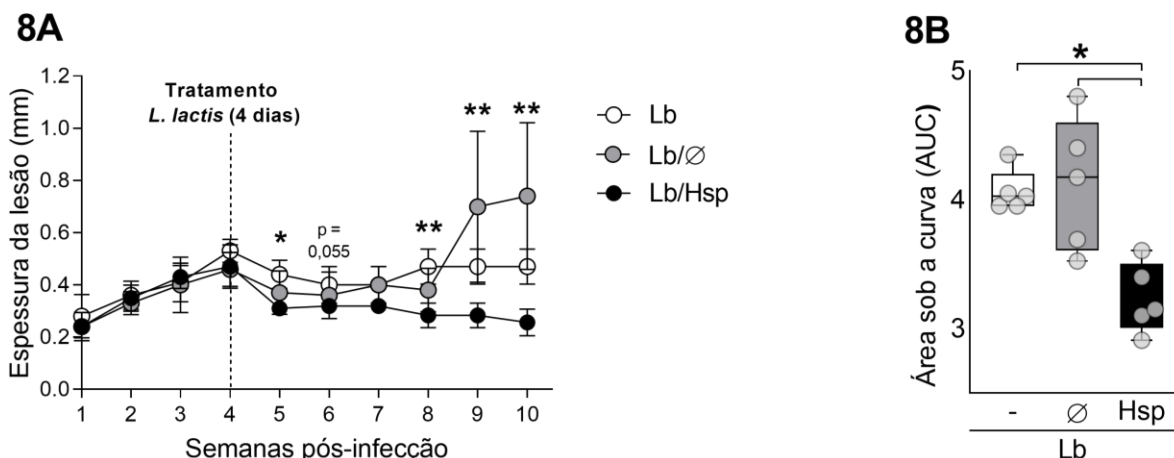


Figura 8 - Cinética do desenvolvimento das lesões cutâneas em camundongos BALB/c administrados com *L. lactis* produtor de Hsp65 após a infecção por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram desafiados na orelha esquerda com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* por via intradérmica. Quatro semanas após infecção, os animais foram administrados por via oral durante 4 dias consecutivos com *L. lactis* produtor de Hsp65 ou contendo o plasmídeo vazio ou água. Grupos experimentais: Lb: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam água durante os 4 dias do tratamento; Lb/∅: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* com o plasmídeo vazio; Lb/Hsp: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* produtor de Hsp65. A espessura das lesões foi acompanhada semanalmente e mensurada com um paquímetro digital. (A) Cinética da espessura da lesão dos animais dos grupos Lb, Lb/∅ e Lb/Hsp. Os dados representam as médias e \pm desvio padrão (DP) de cada grupo e foi utilizado o teste de variância One-Way ANOVA para comparação de mais de dois grupos. (B) Área sob a curva da espessura da lesão foi feita com os dados das medidas das lesões de cada grupo. Os dados representam a mediana e o intervalo interquartil de cada grupo. Os dados são representativos de três experimentos independentes utilizando 5 animais em cada. Foi utilizado o teste de *Kruskal Wallis* com pós-teste de *Dunns*. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$ entre os grupos Lb e Lb/Hsp em 5 e 8 semanas após infecção; e ** para $P < 0,001$ entre os grupos Lb/∅ e Lb/Hsp em 9 e 10 semanas após infecção.

Fonte: Elaborado pela autora

5.2 ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA NO SÍTIO DA INFECÇÃO (ORELHA) E NOS LINFONODOS DRENANTES DA LESÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS APÓS A INFECÇÃO POR *L. BRAZILIENSIS*

Com o intuito de investigar se o tratamento por via oral com *L. lactis* recombinante produtor de Hsp65 interferiu na imunidade parasitária contra a infecção por *L. braziliensis*, as orelhas e os linfonodos drenantes da lesão foram coletados em 6, 7, 8, 9 e 10 semanas após infecção para a quantificação da carga parasitária. O tratamento via oral com Hsp65 promoveu uma diminuição no número de parasitas na orelha em 6, 7, 8 e 9 semanas após infecção, em comparação aos animais apenas infectados (grupo Lb) (Figura 9A).

Similarmente, foi observado uma redução na carga parasitária dos linfonodos drenantes da lesão nos animais do grupo Lb/Hsp, de forma que, nos pontos de 6 e 8 semanas pós-infecção estes animais obtiveram uma diferença significativa quando comparados aos outros grupos experimentais (Figura 9A). Quando foi avaliado a área sob a curva da cinética da carga parasitária na orelha, o grupo Lb/Hsp apresentou uma área significativamente menor em relação

aos animais do grupo Lb/Ø. Na análise do linfonodo drenante, o grupo Lb/Hsp demonstrou uma área menor quando comparado ao grupo Lb (Figura 9B).

Por outro lado, os animais dos grupos Lb e Lb/Ø apresentaram maiores números de parasitos na orelha com 6 semanas de infecção, e posteriormente foi observado uma redução gradual da carga parasitária destes grupos até 10 semanas após infecção. Paralelamente, quando os linfonodos drenantes foram avaliados foi observada um padrão constante no número de parasitas durante todo o período acompanhado nos animais que não foram administrados com Hsp65 (Figura 9A). Na décima semana pós-infecção, os animais dos grupos Lb e Lb/Ø apresentaram poucos parasitas nos sítios da infecção (orelhas e linfonodos drenantes), mas exibiram lesões maiores do que os animais tratados com Hsp65 (Figura 9A), mostrando que a espessura da lesão está diretamente ligada a resposta inflamatória contra infecção e não à presença do parasita. Portanto, nossos dados demonstraram que o tratamento por via oral com *L. lactis* produtor de Hsp65 não interferiu na imunidade parasitária, promovendo redução e controle da carga parasitária nos sítios da infecção.

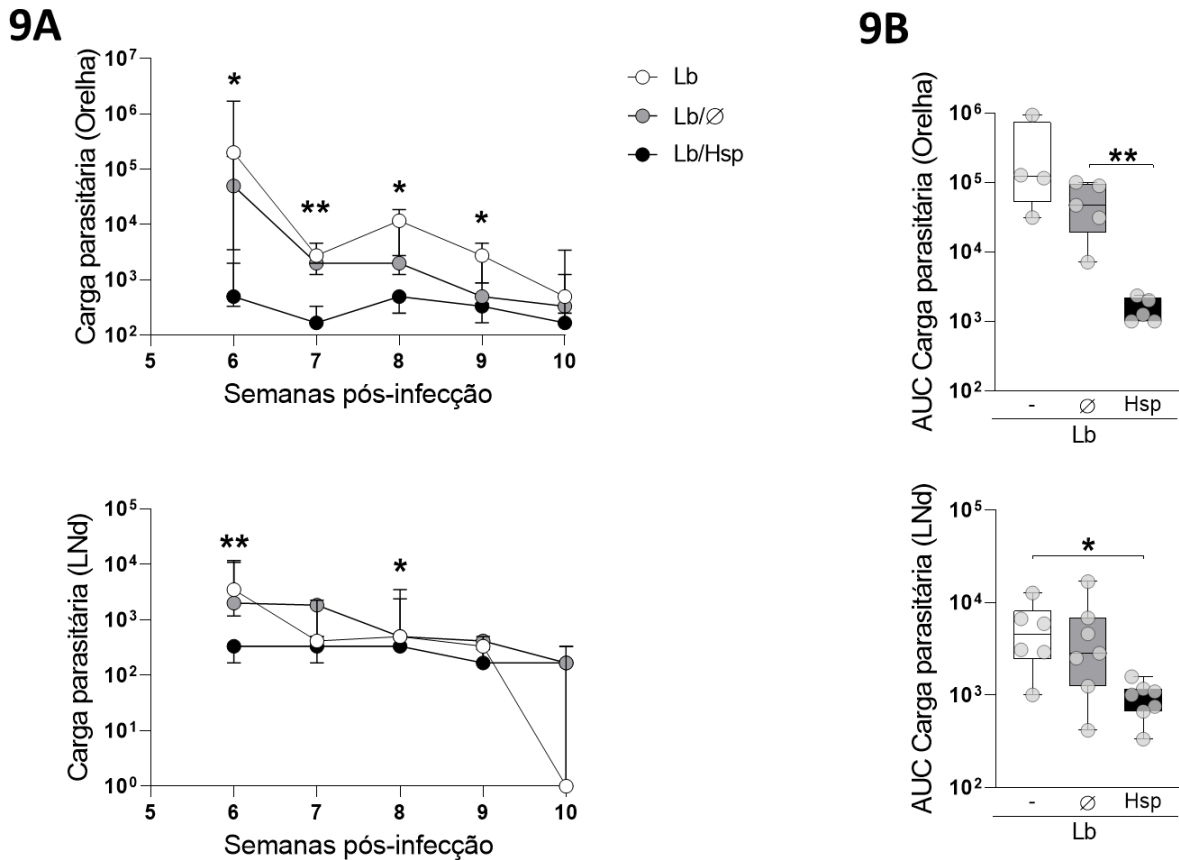


Figura 9 - Cinética da carga parasitária da orelha e do linfonodo drenante da lesão de camundongos BALB/c administrados por via oral com *L. lactis produtor de Hsp65 após a infecção por L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha esquerda por via intradérmica com promastigotas metacíclicas purificadas de *L. braziliensis*. Após completarem 4 semanas de infecção, os animais receberam por via oral o tratamento com *L. lactis* produtor de Hsp65 ou com o plasmídeo vazio ou água. Grupos experimentais: Lb: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam água durante os 4 dias do tratamento; Lb/∅: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* com o plasmídeo vazio; Lb/Hsp: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* produtor de Hsp65. Nos pontos de 6, 7, 8, 9 e 10 semanas pós-infecção, os animais foram eutanasiados e as orelhas e linfonodos drenantes da lesão foram coletados para quantificação da carga parasitária por diluição limitante. (A) Cinética da carga parasitária da orelha (painel superior) e do linfonodo drenante (painel inferior). (B) Área sob a curva da carga parasitária dos sítios de infecção. O número de parasitas está representado pela mediana e intervalo interquartil de cada grupo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes utilizando 5 animais em cada. Para dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dunns*. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$ entre os grupos Lb e Lb/Hsp nos pontos 6, 8 e 9 semanas pós-infecção; e ** para $P < 0,001$ entre os grupos Lb e Lb/Hsp em 6 e 7 semanas de infecção.

Fonte: Elaborado pela autora

5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS IFN- γ , IL-10, TGF- β E IL-4 PELAS CÉLULAS DO LINFONODO DRENANTE DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS COM HSP65 APÓS A INFECÇÃO POR *L. BRAZILIENSIS*

Com o objetivo de avaliar o perfil da resposta imune após o tratamento por via oral com *L. lactis* produtor de Hsp65, foi realizada a quantificação da produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias nos pontos de 6, 7, 8, 9 e 10 semanas após infecção. A produção das citocinas foi realizada por ELISA, utilizando a cultura de células do linfonodo drenante da lesão

reestimulada com promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis*. Os resultados mostraram que os animais tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65 aumentaram significativamente a produção de IL-10 a partir da 8ª semana após infecção, quando comparados aos animais dos grupos Lb e Lb/Ø (Figura 10A – painel esquerdo).

Em relação a produção de IFN- γ , os animais do grupo Lb/Hsp apresentaram uma redução com 6 semanas pós-infecção, no entanto a partir da 8ª semana foi observado um aumento na produção desta citocina em comparação aos outros grupos acompanhados (Figura 10A – painel direito). A produção de TGF- β e IL-14 foram determinadas, porém não foram observadas diferenças entre os grupos (dados não mostrados). Também foi observado que a maioria das concentrações das citocinas produzidas pelos grupos Lb e Lb/Ø foram similares, evidenciando que a administração de *L. lactis* com o plasmídeo vazio não foi capaz de alterar o perfil da produção de citocinas neste estudo.

Diante disso, os dados sugerem que a redução na produção de IFN- γ nos animais tratados com Hsp65 no início da infecção forneceu proteção contra o dano tecidual, evidenciado no desenvolvimento de lesões menores deste grupo (Figura 10A), e o aumento da produção das citocinas IL-10 e IFN- γ ao decorrer da infecção promoveu uma manutenção desta proteção e no controle da carga parasitária nos animais que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65.

A fim de identificar qual era a citocina predominante sendo produzida em cada tempo pós infecção, foi analisado a razão da produção entre as citocinas IL-10/IFN- γ . O grupo Lb/Hsp apresentou uma produção maior de IL-10 em relação à IFN- γ com 6 semanas pós-infecção, apesar de não existir diferença estatisticamente significativa com os outros grupos (Figura 10B). Ao decorrer da infecção, a razão da produção entre as citocinas IL-10/IFN- γ não mostrou nenhuma diferença nos animais tratados com Hsp65, no entanto o grupo Lb parece aumentar sua produção de IL-10 em relação a IFN- γ com 10ª semana pós-infecção (Figura 10B).

Dessa forma, os dados sugerem que há uma possível imunomodulação consequente do balanço da produção entre as citocinas pro- e anti-inflamatórias, que se mostrou importante para o controle e proteção contra o dano tecidual e a carga parasitária no grupo tratado com Hsp65.

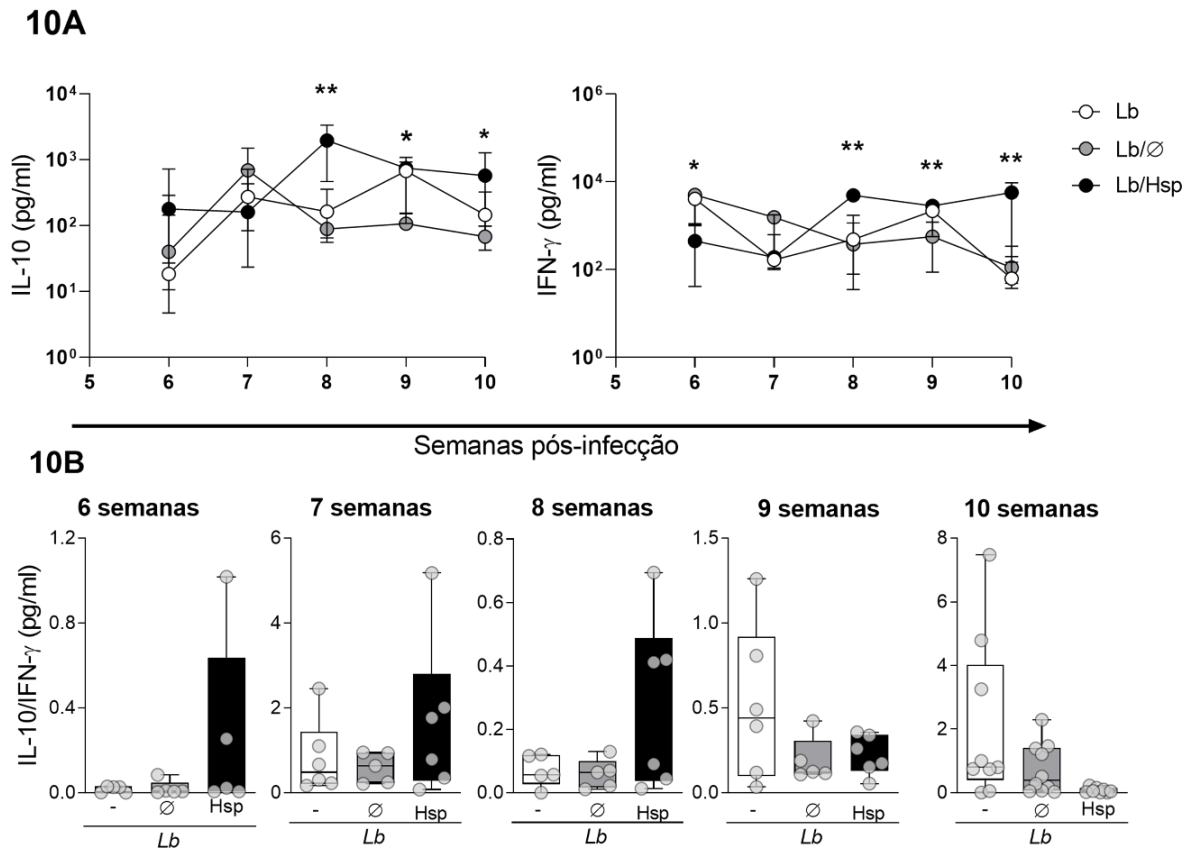


Figura 10 - Cinética da produção de citocinas pro- e anti-inflamatórias e a razão da produção IL-10/IFN- γ das células do linfonodo drenante da lesão de camundongos BALB/c administrados com *L. lactis* produtor de Hsp65 após a infecção por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram desafiados na orelha esquerda via intradérmica com promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* na fase estacionária. Com 4 semanas de infecção, os animais foram administrados por via oral com água, *L. lactis* com plasmídeo vazio ou produtor de Hsp65. Grupos experimentais: Lb: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam água durante os 4 dias do tratamento; Lb/∅: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* com o plasmídeo vazio; Lb/Hsp: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* produtor de Hsp65. Após 6, 7, 8, 9 e 10 semanas de infecção, a eutanásia dos animais foi realizada e os linfonodos drenantes da lesão foram coletados para serem macerados. As células obtidas dos linfonodos drenantes foram cultivadas e reestimuladas *in vitro* com promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* (5 parasitas:1 célula) por 48 ou 72 horas. Posteriormente, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados para dosagem de citocinas por ELISA. (A) Cinética da produção das citocinas IL-10 (painel direito) e IFN- γ (painel esquerdo). (B) Razão da produção de IL-10/IFN- γ . Os dados estão representados pela mediana e intervalo interquartil de cada grupo. Os dados são representativos de três experimentos independentes utilizando 10 animais em cada. Para dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dunns*. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$ entre os grupos Lb e Lb/Hsp em 6 e 8 semanas pós-infecção e Lb/∅ e Lb/Hsp em 6, 9 e 10 semanas pós-infecção; ** para $P < 0,001$ entre os grupos Lb e Lb/Hsp em 7, 8 e 10 semanas de infecção e Lb/∅ e Lb/Hsp em 8 semanas de infecção.

Fonte: Elaborado pela autora

5.4 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T REGULADORAS NAS CULTURAS DE CÉLULAS DOS LINFONODOS DRENANTES DA LESÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS COM *L. LACTIS*-HSP65 APÓS A INFECÇÃO

Com o objetivo de se avaliar se o tratamento por via oral com *L. lactis* produtor de Hsp65 alterou a frequência de células Tregs, foi analisado *ex vivo* as células T dos linfonodos drenantes da lesão por citometria de fluxo. Com 6, 7 e 8 semanas pós-infecção, os animais

tratados com Hsp65 apresentaram uma frequência maior de células T CD4⁺LAP⁺ quando comparados com os animais dos grupos Lb/∅ e Lb (Figura 11).

11 .

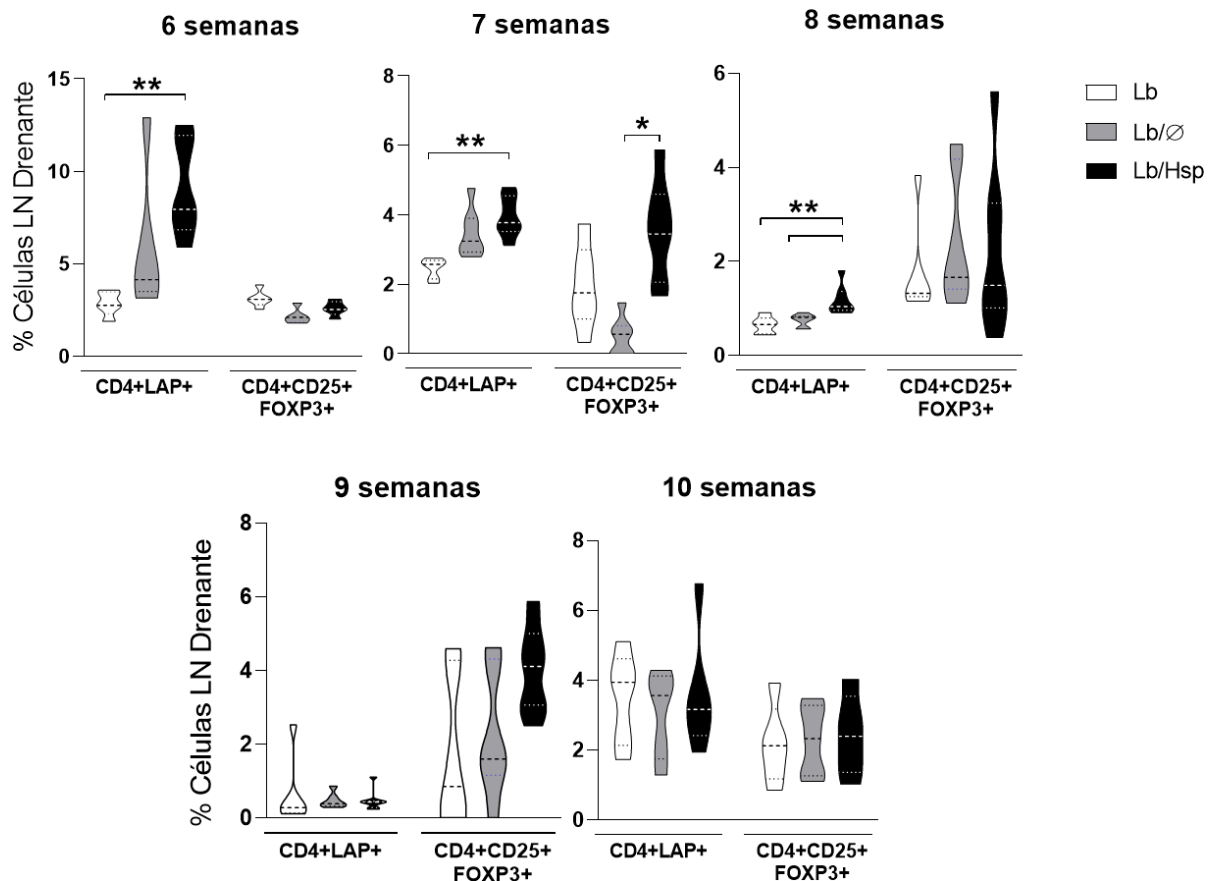


Figura 11 - Frequência das células T regulatórias CD4⁺LAP⁺ e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no linfonodo drenante da lesão de camundongos BALB/c administrados com *L. lactis* produtor de Hsp65 após a infecção por *L. braziliensis*. A infecção foi realizada na orelha esquerda de camundongos BALB/c por via intradérmica com 5x10⁵ de promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* na fase estacionária. Após 4 semanas de infecção, os animais receberam o tratamento por via oral com *L. lactis* com o plasmídeo vazio, ou produtor de Hsp65 ou água durante 4 dias consecutivos. Grupos experimentais: Lb: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam água durante os 4 dias do tratamento; Lb/∅: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* com o plasmídeo vazio; Lb/Hsp: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* produtor de Hsp65. Os animais foram eutanasiados nos pontos de 6, 7, 8, 9 e 10 semanas pós-infecção e os linfonodos drenantes da lesão foram coletados para análise ex vivo. As células do linfonodo drenante foram isoladas, marcadas e posteriormente adquiridas no citômetro de fluxo. Frequência das células T regulatórias CD4⁺LAP⁺ e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no linfonodo drenante da lesão em diferentes tempos pós-infecção. Os dados estão representados pela mediana e intervalo interquartil de cada grupo. Os dados são representativos de três experimentos independentes utilizando 10 animais em cada. Para dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dunns*. Foi atribuído * para valores de $P < 0,05$, ** para $P < 0,001$.

Fonte: Elaborado pela autora

Com 9 e 10 semanas pós-infecção, não foi possível observar diferenças significativas entre as frequências das células T CD4⁺LAP⁺ provenientes dos linfonodos drenantes. Da mesma forma, foi observado uma frequência maior de células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ nos

animais do grupo Lb/Hsp com 7 semanas pós-infecção (Figura 11). Nos pontos de 6, 8, 9 e 10 semanas pós-infecção, a frequência das células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais.

5.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS COM HSP65 APÓS A INFECÇÃO

Para avaliar se o tratamento oral pós-infecção com *L. lactis* produtora de Hsp65 era capaz de promover a diminuição da inflamação causada pela infecção por *L. braziliensis*, foi acompanhado o desenvolvimento das lesões cutâneas nas orelhas dos camundongos infectados tratados ou não com *L. lactis* recombinante. Os animais do grupo Lb/Hsp apresentaram uma resposta inflamatória menos intensa, com a ausência da formação de úlceras na maioria dos animais quando comparados aos outros grupos. Esta diminuição da resposta inflamatória, foi observada após 6 semanas de infecção e persistiu em todos os pontos de infecção até a 10^a semana (Figura 12).

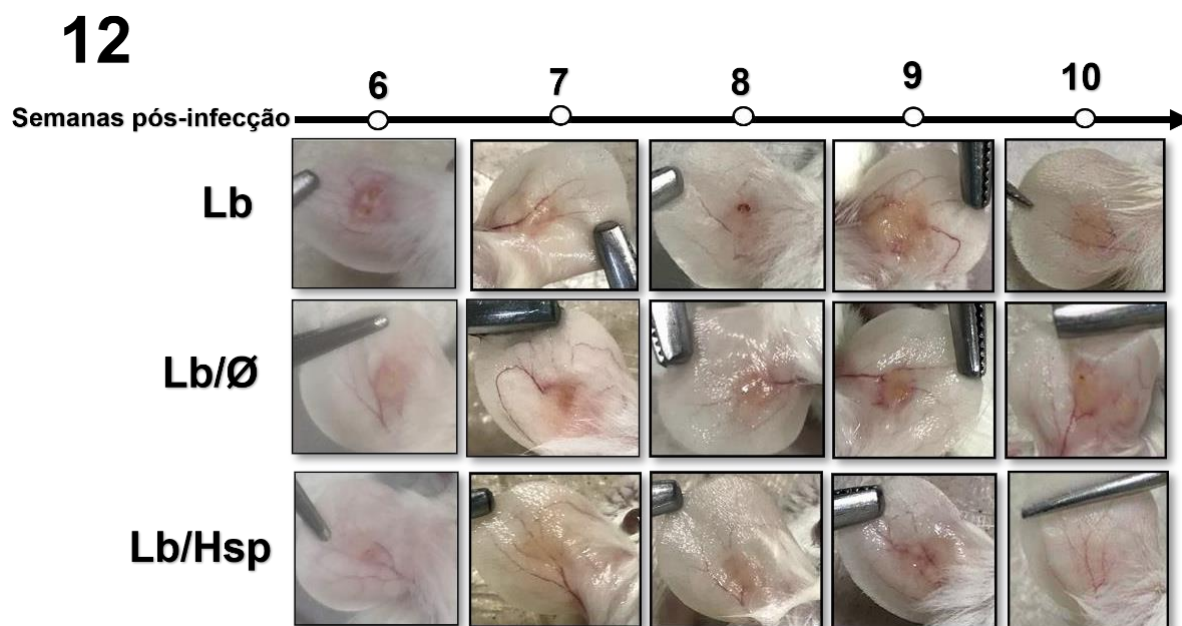


Figura 12 - Desenvolvimento das lesões causadas pela infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c tratados com Hsp65. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha esquerda via intradérmica com 5×10^5 de promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* na fase estacionária. Após 4 semanas de infecção, os animais receberam o tratamento por via oral com *L. lactis* com o plasmídeo vazio, ou produtor de Hsp65 ou água durante 4 dias consecutivos. Grupos experimentais: Lb: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam água durante os 4 dias do tratamento; Lb/Ø: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* com o plasmídeo vazio; Lb/Hsp: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* produtor de Hsp65. As lesões foram fotografadas com 6, 7, 8, 9 e 10 semanas de infecção para análise macroscópica. As fotos são representativas de três experimentos independentes utilizando 10 animais cada por grupo.

Fonte: Elaborado pela autora

Diferentemente do grupo Lb/Hsp, os grupos Lb e Lb/Ø apresentaram uma resposta intensa com lesões ulceradas com bordas elevadas após 6 semanas de infecção (Figura 12). Diante desta observação, nossos dados demonstraram que a administração por via oral de *L. lactis* recombinante foi capaz de diminuir a inflamação nas lesões de animais tratados com Hsp65 a partir de uma análise macroscópica (Figura 12).

Posteriormente, foi analisado o escore inflamatório das lesões nas orelhas dos camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* tratados ou não com *L. lactis* produtora de Hsp65. A análise histopatológica foi realizada através de cortes histológicos das orelhas coletadas nos pontos de 6, 7, 8, 9 e 10 semanas após infecção. Os principais parâmetros utilizados na análise foram: intensidade da inflamação, presença de macrófagos, células polimorfonucleares e células epitelióides. Em relação a intensidade da inflamação, os animais do grupo Lb/Hsp apresentou uma possível diminuição na inflamação ao decorrer das semanas após infecção, em comparação ao grupo Lb, apesar de não haver diferenças significativas entre os grupos (Figura 13). Este mesmo perfil, foi observado na presença de macrófagos e células polimorfonucleares, nos quais o grupo Lb/Hsp evidenciou, supostamente, uma pequena redução na presença destas células no sítio da infecção, em relação aos animais do grupo Lb (Figura 13). Não foi possível observar nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais ao que concerne a presença de células epitelióides.

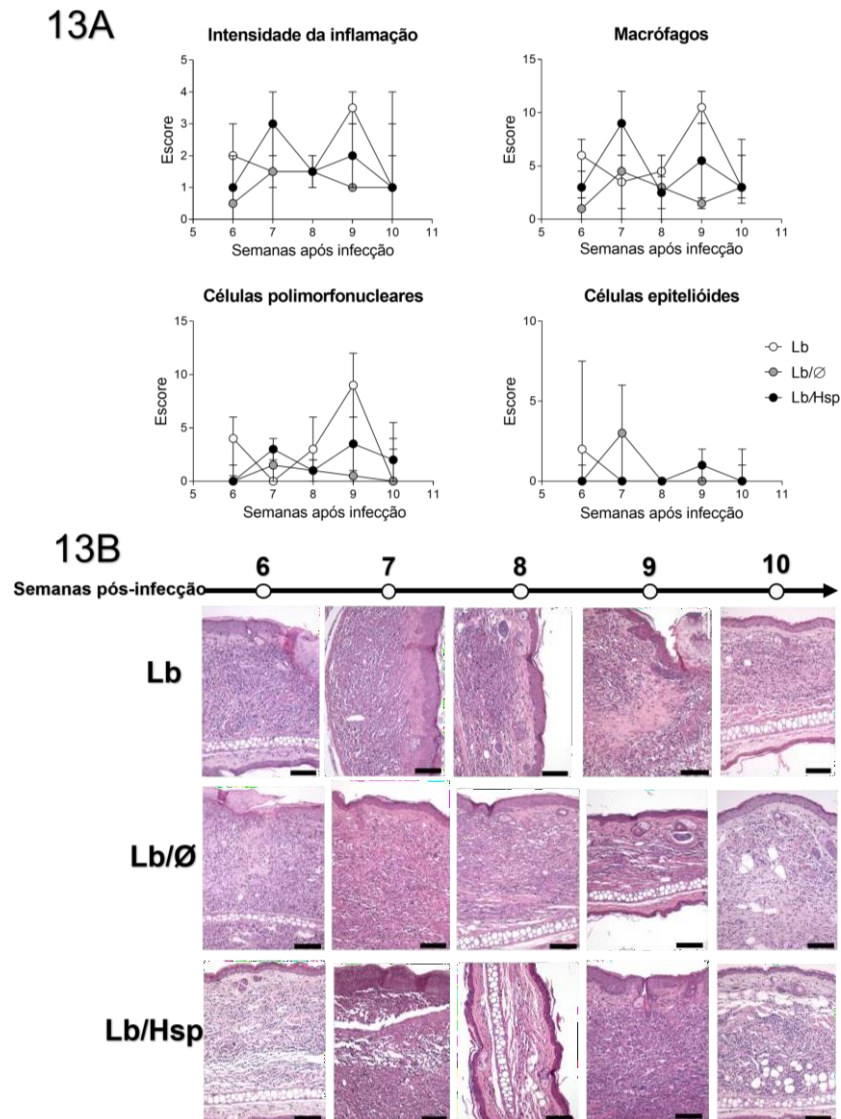


Figura 13 - Escore inflamatório e análise histopatológica das lesões nas orelhas dos camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados com *L. lactis* produtora de Hsp65. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha esquerda via intradérmica com 5×10^5 de promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* na fase estacionária. Com 4 semanas de infecção, os animais receberam o tratamento por via oral com *L. lactis* com o plasmídeo vazio, ou produtor de Hsp65 ou água durante 4 dias consecutivos. Grupos experimentais: Lb: animais infectados com *L. braziliensis* e que receberam água durante os 4 dias do tratamento; Lb/∅: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* com o plasmídeo vazio; Lb/Hsp: animais infectados com *L. braziliensis* e com 4 semanas após infecção receberam durante 4 dias consecutivos por via oral *L. lactis* produtor de Hsp65. Após de 6, 7, 8 e 9 semanas de 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 estão representados nesta figura. Cada parâmetro foi avaliado segundo presença ou ausência do evento através de escores: 0 (ausência), 1 (presença de 1-25%), 2 (presença de 25-50%) e 3 (>50%). A análise dos parâmetros histopatológicos foi feita levando-se em conta os escores de cada animal. Foi realizado a correção dos escores dos parâmetros da presença de macrófagos, células polimorfonucleares e células epitelióides em relação ao escore da intensidade da inflamação de cada animal. Orelhas de animais saudáveis foram utilizadas como controle negativo e apresentaram score 0 para todos os parâmetros analisados. (A) Cinética do escore inflamatório dos parâmetros histopatológicos analisados. Os dados estão representados pela mediana de cada grupo em cada tempo de eutanásia. (B) Cortes histológicos representativos de cada animal por grupo nos tempos de 6, 7, 8, 9 e 10 semanas de infecção (20X). As linhas pretas no canto inferior das imagens representam a espessura do corte histológico (100 μ m).

Fonte: Elaborado pela autora

Considerando todos estes dados, os animais que receberam a administração oral de *L. lactis* produtora de Hsp65 após a infecção por *L. braziliensis*, apresentaram um perfil inflamatório agudo (Figura 13). Desta forma, pode-se dizer que provavelmente o tratamento oral com Hsp65 promoveu uma diminuição na cronicidade da doença, que corrobora com o tamanho menor das lesões e a ausência de ulceração nos animais tratados com Hsp65 nas últimas semanas após infecção.

6 DISCUSSÃO

A LC apresenta lesões com aspectos clínicos e imunopatológicos distintos de acordo com a espécie causadora da doença e da resposta imune do hospedeiro. A infecção por *L. braziliensis* é conhecida por sua cronicidade, latência e tendência a metastizar no hospedeiro humano, como em casos de lesões mucocutâneas (MARSDEN, 1986; SILVEIRA et al., 2009). No local da picada do flebotomíneo, lesões cutâneas aparecem como únicas ou múltiplas, sendo mais comum, a úlcera indolor, de bordas bem delimitadas e elevadas com fundo necrótico. Além disso, há o desenvolvimento de uma intensa resposta inflamatória com um perfil de células Th1 produtoras de citocinas pro-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Neste contexto, uma resposta imune celular exacerbada é uma das causas responsáveis da destruição tecidual no sítio da infecção, apesar da escassez de parasitas no local (BITTENCOURT; BARRAL, 1991; SCHRIEFER; WILSON; CARVALHO, 2008). Assim, é relevante o estudo de possíveis alternativas terapêuticas que favoreçam a diminuição da inflamação causada pela infecção por *L. braziliensis*, restaurando o equilíbrio entre a resposta imune e a eliminação do parasita.

A indução da TO tem se tornado alternativa terapêutica promissora em vários modelos de doenças autoimunes, como também em doenças inflamatórias (FARIA; WEINER, 1999, 2006). A TO é considerada um evento imunológico natural, pois permite diariamente que inúmeras proteínas exógenas derivadas da alimentação sejam reconhecidas como próprias, sem induzir reatividade imunológica (MOWAT, 1987; VAZ et al., 1977). A TO induzida é uma forma eficaz de indução de células Tregs. Foi demonstrado que estas células inibem por exemplo, a hipersensibilidade tardia (DTH-*delayed type hypersensitivity*) mediada por células T e respostas dependentes de imunoglobulina E (IgE) (DE FARIA et al., 1998; MOWAT, 1987).

A TO pode também ser induzida pela ingestão contínua de antígenos, como proteínas solúveis, gerando células Tregs (MOWAT, 2018), capazes de suprimir a resposta inflamatória em modelos experimentais de doenças autoimunes (FARIA; WEINER, 2006; YOSHINO; QUATTROCCHI; WEINER, 1995). Embora diversos mecanismos tenham sido propostos para explicar este fenômeno, a indução de células Tregs como CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺LAP⁺, assim como a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β parecem ser essenciais para indução de TO (WEINER; WU, 2011). Na maioria dos estudos, a utilização do mesmo antígeno causador da doença induz a TO, sendo uma forma eficiente de

gerar células Tregs antígeno-específicas (CASTRO-JUNIOR et al., 2012). Um exemplo disto é o caso da administração oral de glicoproteína da mielina de oligodendrócito (MOG) no modelo de encefalomielite experimental e da insulina no modelo de diabetes tipo 1 (HIGGINS; WEINER, 1988; ZHANG et al., 1991). No entanto, foi demonstrado que através de uma supressão “*bystander*”, antígenos não relacionados à patologia da doença também inibem efeitos inflamatórios. Esse mecanismo se tornou bastante interessante quando o objetivo é estudar modelos de doenças com o antígeno-alvo ainda desconhecido ou quando existem diversos antígenos desencadeando a patologia (FARIA; WEINER, 2006). Essa supressão deve-se a capacidade da TO em ampliar seu efeito inibitório a outros antígenos, pela ação de células Tregs não específicas ao antígeno causador da doença e produtoras de citocinas anti-inflamatórias (MILLER; LIDER; WEINER, 1991; WEINER; WU, 2011).

Na busca de antígenos capazes de induzir mecanismos imunossupressores, as Hsps foram escolhidas por serem encontradas em eventos inflamatórios, na maioria dos organismos, das bactérias aos mamíferos. Sendo assim, são altamente conservadas entre as espécies, possuindo alta similaridade entre elas (HAUET-BROERE et al., 2006; QUINTANA; COHEN, 2011). Além disso, as Hsps possuem uma atividade reguladora no sistema imune, e seu papel anti-inflamatório já foi demonstrado em diversos modelos de doenças autoimunes e inflamatórias, como artrite, aterosclerose, diabetes e esclerose múltipla (CHANDAWARKAR et al., 2004; ELIAS et al., 1990; MARON et al., 2002; VAN DEN BROEK et al., 1989). Em estudos de modelos de artrite induzida por adjuvante em ratos Lewis (COBELENS et al., 2002) e aterosclerose em camundongos (HARATS et al., 2002; MARON et al., 2002), foi demonstrado que a administração oral de Hsp65 recombinante derivada de *M. leprae* foi capaz de induzir tolerância e proteger os animais contra as doenças.

Recentemente, o nosso grupo desenvolveu o primeiro trabalho que utilizou a Hsp65 recombinante derivada de *M. leprae* como proteína indutora da TO com o objetivo de atenuar a inflamação causada por infecção de um parasita, como a *Leishmania spp.* (GUERRA et al., 2021). Neste presente trabalho, com o objetivo de induzir mecanismos tolerogênicos na mucosa intestinal para suprimir a inflamação após a infecção, utilizamos a tecnologia de entrega da proteína Hsp65 livre de endotoxina diretamente no lúmen intestinal por ingestão contínua (4 dias consecutivos) através do sistema de liberação com a cepa *L. lactis* recombinante desenvolvido por Azevedo et al (2012).

A utilização da bactéria *L. lactis* já é bem conhecida por ser não patogênica, invasiva e colonizadora, além das suas propriedades probióticas, principalmente utilizada pela indústria de alimentos fermentados (CAVANAGH; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2015). Uma

vantagem muito interessante é que o uso destas bactérias recombinantes possibilita a liberação da Hsp no intestino, poupando gastos elevados com a proteína purificada (PONTES et al., 2011). Também foi demonstrado com sucesso em outros modelos experimentais de colite, que o uso da *L. lactis* recombinante é capaz de induzir a secreção de citocinas como IL-10 (STEIDLER et al., 2000), nanocorpo anti-TNF (VANDENBROUCKE et al., 2009) e a proteína LcrV (produzida pela bactéria *Yersinia pestis* que atua inibindo a inflamação pela interação com receptores TLR2) (FOLIGNE et al., 2007).

Os nossos resultados mostraram, que o tratamento oral com a cepa recombinante de *L. lactis* produtora de Hsp65 derivada da *M. leprae* após 4 semanas de infecção por *L. braziliensis*, diminui os sinais da inflamação e o desenvolvimento das lesões, reparando o tecido da orelha dos camundongos tratados com Hsp65 (Figura 8A-D). Já os animais do grupo Lb e Lb/Ø apresentaram lesões com intensa destruição tecidual, ulceração e fundo necrótico (Figura 12), resultado de uma resposta imune celular exacerbada como observado no modelo experimental de LC. A ulceração e a destruição tecidual na LC estão associadas com uma resposta inflamatória intensa, concentrando vários mediadores inflamatórios no sítio da infecção (RETHI; EIDSMO, 2012; TASEW et al., 2010). Pacientes acometidos com LC localizada e disseminada causada por *L. braziliensis* apresentaram uma resposta efetora de células T contra o parasita em linfócitos circulantes, e estudos histopatológicos confirmaram a presença do infiltrado acentuado de células T produtoras de citocinas e quimiocinas inflamatórias na lesão (CARVALHO et al., 2012; LEOPOLDO et al., 2006; MACHADO et al., 2011).

A LC causada por *L. braziliensis* é caracterizada por uma baixa carga parasitária em combinação com uma resposta eficiente de células T anti-leishmania, que está associada com a ulceração (AKUFFO et al., 1987). Por outro lado, a LD por *L. aethiopica* apresenta uma alta carga de parasitas e uma resposta ineficiente de células T, e observa-se que a doença não é ulcerativa (CARVALHO et al., 1994; COSTA et al., 1986; NILSEN; HANA, 1987; TURETZ et al., 2002). No modelo experimental, camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* também apresentam lesões cutâneas localizadas, ulceradas com bordas elevadas e fundo necrótico, similares aquelas desenvolvidas por pacientes com LC americana (DE MOURA et al., 2005; JOHNSON et al., 1987). Desta forma, uma estratégia de tratamento promissor é a modulação da resposta imune à infecção por *Leishmania*, em que os mecanismos antiparasitários sejam maximizados, mas a destruição tecidual minimizada (RETHI; EIDSMO, 2012; TASEW et al., 2010).

Um dos primeiros achados sobre o papel regulatório das Hsps na resposta imune, demonstrou que a pré-imunização com Hsp60 inibiu a artrite induzida por adjuvante por *M.*

tuberculosis em ratos (EDEN et al., 1988). Vários trabalhos já têm demonstrado as características anti-inflamatórias das Hsps, tanto em modelos animais quanto em humanos (ALBANI et al., 1995; DE KLEER et al., 2004; PRAKKEN et al., 2004; RAZ et al., 2001; VAN EDEN; VAN DER ZEE; PRAKKEN, 2005; VAN EDEN; WAKSMAN, 2003). Um dos estudos, por exemplo, evidenciou que o pré-tratamento utilizando Hsp70 em modelo de artrite experimental inibiu a doença e reduziu significativamente a gravidade clínica. No modelo de encefalomielite experimental, ratos que receberam previamente o peptídeo da Hsp65 também apresentaram redução na gravidade da doença e supressão das respostas inflamatórias (BIRNBAUM et al., 1996).

Nossos achados demonstraram que o tratamento oral com *L. lactis* produzindo Hsp65 realizado após 4 semanas de infecção por *L. braziliensis*, reduziu não somente o desenvolvimento das lesões e o dano tecidual, mas também promoveu o controle da infecção, diminuindo a carga parasitária a partir de 6 semanas pós-infecção no sítio de inoculação e nos linfonodos drenantes da lesão (Figura 9A-B). Vale ressaltar que os animais tratados com Hsp65 apresentaram desde o início um número reduzido de parasitas nos sítios da infecção associada também com uma menor espessura de lesão e sinais de inflamação quando comparados aos animais não tratados ou com aqueles que receberam a bactéria com plasmídeo vazio (Figura 8, 9 e 12). Estes dados corroboram com trabalhos da literatura que, em modelos murinos de infecção por *Leishmania*, mostram que a diminuição da espessura da lesão está muitas vezes associada com a redução da carga parasitária no sítio de inoculação (AGUIAR et al., 2009; RIBEIRO-ROMÃO et al., 2016). No entanto, nas últimas semanas da infecção, foi observado que um número de parasitas persistiu nos linfonodos drenantes da lesão do grupo Lb/Hsp mesmo após a resolução da lesão na orelha destes animais.

Alguns trabalhos já evidenciaram que os parasitas podem ser eliminados até a cura da lesão, mas persistem nos linfonodos drenantes possivelmente por causa de mecanismo regulatórios envolvidos, permitindo sua sobrevivência (COSTA et al., 2011; DE MOURA et al., 2005; FALCÃO et al., 2012; ROCHA et al., 2007). Entre os mecanismos envolvidos, destacam-se aqueles dependentes de IL-10 que contribuem para a persistência do parasita e na manutenção de células T CD4⁺ efectoras de memória, importantes na proteção contra uma reinfecção (BELKAID et al., 2002; PETERS et al., 2014). Além disso, tem sido descrito a atuação de células Tregs tanto na persistência de *L. major*, quanto no controle da patologia (BELKAID et al., 2002; LIMA; DEKREY; TITUS, 1999; MENDEZ et al., 2004; PORROZZI et al., 2004).

Surpreendentemente, nossos resultados mostram que os animais tratados com *L. lactis* produtora de Hsp65 após a infecção por *L. braziliensis* atenuaram a destruição tecidual, além de reduzir a carga parasitária nos sítios de infecção (Figura 8 e 9). Estes resultados estão associados com os mecanismos de tolerância, uma vez que, a resposta necessária para reduzir a carga do patógeno pode levar ao desenvolvimento da lesão por uma reação exacerbada. Neste caso, a tolerância promove a redução da inflamação causada pela infecção no hospedeiro, mas sem interferir diretamente na capacidade do mesmo em eliminar o parasita (RÅBERG; GRAHAM; READ, 2009; READ; GRAHAM; RÅBERG, 2008; SCHNEIDER; AYRES, 2008). A tolerância diminui os danos causados no hospedeiro pelos patógenos ou pela resposta imune formada contra ele (MEDZHITOV; SCHNEIDER; SOARES, 2012). Uma boa resposta imune é o resultado do equilíbrio entre um nível aceitável de imunopatologia e a eliminação do patógeno (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999), estes dados corroboram com os nossos resultados observados no grupo de animais tratados com Hsp65.

Um dos principais mecanismos de proteção contra a doença é a atuação de mediadores inflamatórios na eliminação do parasita. Já foi demonstrado em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* que a cura das lesões foi acompanhada pelo aumento de IFN- γ . Por outro lado, quando tratados com anti-IFN- γ , os animais progrediram com a doença e desenvolveram lesões significativamente maiores, indicando que a resolução das lesões e a cura da doença dependem da produção de IFN- γ (LIMA; DEKREY; TITUS, 1999).

Outros trabalhos também já demonstraram a participação importante de citocinas como IL-2 e TNF- α na eliminação dos parasitas das lesões de camundongos BALB/c (ROCHA et al., 2007). Além disso, pacientes com LC causada por *L. braziliensis* apresentando lesões mais graves, exibiam uma produção maior de IFN- γ e interleucina 17 (IL-17) (ANTONELLI et al., 2004, 2005; BACELLAR et al., 2002). Por outro lado, indivíduos subclínicos com produção moderada de IFN- γ conseguiram controlar o crescimento do parasita, sem causar danos teciduais (FOLLADOR et al., 2002).

Nossos resultados mostraram uma diminuição de IFN- γ , 2 semanas após o tratamento com Hsp65 (6 semanas pós-infecção) (Figura 10A), porém não houve diminuição na eliminação do parasita, sugerindo que a concentração presente dessa citocina induziu a morte parasitária, sem causar inflamação exacerbada, como observado nos pacientes subclínicos. Esse mesmo tipo de achado foi observado em modelos de aterosclerose onde houve a diminuição do escore clínico da doença, através aumento da produção de IL-10 e redução de IFN- γ após a indução de tolerância oral por Hsp65 (JING et al., 2011).

De fato, a diminuição na produção do IFN- γ nos animais do grupo Lb/Hsp observado em nossos resultados parece ser uma consequência do aumento da IL-10 pelas células dos linfonodos drenantes da lesão, a partir da 8ª semana de infecção em relação aos grupos que não receberam Hsp65 (Figura 10A). A razão entre a produção de IL-10 e IFN- γ , no tratamento oral com *L. lactis* produtora de Hsp65 mostrou uma produção maior de IL-10 em relação ao IFN- γ nas células do linfonodo drenante da lesão, nas primeiras semanas após à administração do tratamento (6, 7 e 8 semanas após infecção) (Figura 10B), embora, diferenças significativas entre os grupos experimentais não foram encontradas. Novos experimentos estão sendo realizados para a confirmação destes achados.

Interessante observar que, os animais que receberam o tratamento oral com *L. lactis* produtora de Hsp65 após a infecção por *L. braziliensis* aumentaram significativamente a frequência de células CD4⁺LAP⁺ (6, 7 e 8 semanas de infecção) e CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (7 semanas de infecção) nos linfonodos drenantes da lesão quando comparados com os animais somente infectados (Figura 11), confirmando o papel importante destas células na produção de IL-10 e TGF- β .

A IL-10 é uma citocina importante na inibição da resposta Th1, suprimindo muitas funções efetoras dos macrófagos (FIORENTINO et al., 1991). Embora esteja associada com a sobrevivência e persistência do parasita, alguns trabalhos já demonstraram que essas citocinas anti-inflamatórias suprimem reações inflamatórias e auxiliam no processo de cicatrização, quando produzidas em baixos níveis (ALLEN; WYNN, 2011; GAUSE; WYNN; ALLEN, 2013; PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014).

Diversos trabalhos têm demonstrado o aumento da produção de IL-10 após indução por Hsp em modelos experimentais. Maron e colaboradores mostraram que administração oral de Hsp65 aumentou os níveis de IL-10 localmente e assim reduziu a inflamação no modelo de aterosclerose (MARON et al., 2002). Em modelo de colite, Gomes-Santos e colaboradores observaram que a administração de *L. lactis* produtora de Hsp65 foi essencial na manutenção da produção de IL-10 no tecido do cólon, promovendo efeitos imunoregulatórios (GOMES-

SANTOS et al., 2017). Mais uma vez, no modelo de encefalomielite experimental, a administração oral de *L. lactis*-Hsp65 preveniu a patogênese da doença associada ao aumento da produção de IL-10 por células do linfonodo mesentérico e do baço (REZENDE et al., 2013).

Desta forma, acreditamos que nossos achados estão de acordo com estes trabalhos, e que o aumento de IL-10 induzida pelo tratamento oral de *L. lactis*-Hsp65 após a infecção por *L. braziliensis* promoveu a redução da inflamação encontrada nas lesões dos camundongos tratados com Hsp65.

Em um estudo recente do nosso grupo, a administração prévia utilizando a mesma cepa de *L. lactis* recombinante mostrou também o aumento de IL-10 e a redução de IFN- γ produzidos pelas células dos linfonodos drenantes da lesão causada por *L. braziliensis*, isso contribuiu na redução da severidade da doença, como a ausência de ulceração (GUERRA et al., 2021). Também foi demonstrado que a produção de IFN- γ favoreceu o controle da infecção, como observado no presente trabalho nos animais que receberam tratamento pós-infecção com Hsp65 (Figura 9 e 10). Além disso, foi demonstrado por Guerra e colaboradores que a produção de IL-10 e IFN- γ é dependente de TRL2, LAP e IL-10, pois a neutralização destas moléculas utilizando anticorpos monoclonais em modelo in vitro com células dos linfonodos mesentéricos e dos linfonodos drenantes (GOMES-SANTOS et al., 2017; GUERRA et al., 2021; GUSMAO-SILVA et al., 2020), mostrou o aumento de IFN- γ e a diminuição de IL-10.

A mucosa intestinal é conhecida como um ambiente tolerogênico privilegiado na geração de células Tregs que expressam LAP na sua superfície (CHEN et al., 2008; NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001; OIDA et al., 2003). No modelo de encefalomielite, Gomes-Santos e colaboradores acreditam que células CD4⁺LAP⁺ e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ encontradas em altas concentrações nos linfonodos mesentéricos foram induzidas ou ativadas na mucosa intestinal após a administração prévia por via oral de *L. lactis* produtora de Hsp65. Através de vias eferentes deste sítio, estas células migram para órgãos linfoides secundários (REZENDE et al., 2013), corroborando com os nossos achados.

Outra citocina que parece ser importante na modulação da resposta imune é TGF- β , um fator de crescimento com funções anti-inflamatórias e imunossupressoras, além de ter um papel essencial na homeostase do sistema imune e na indução de tolerância (HANSEN et al., 2000). No entanto, nos nossos achados não encontramos diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação a essa citocina, embora um aumento de células TCD4⁺LAP⁺ foram encontradas nos linfonodos drenantes, 6, 7 e 9 semanas após a infecção (Figura 11). Podemos hipotetizar que as células T CD4⁺LAP⁺ migraram, e não detectamos diferenças no TGF- β , pois esta citocina ativa está ligada à membrana destas células.

TGF- β está envolvida na supressão da resposta Th1, inibindo a diferenciação de células T em Th1 e promovendo a diferenciação de células nTregs induzidas nos órgãos linfoides periféricos (LAOUAR et al., 2005; LUCAS et al., 2000; NAKAO et al., 2000; SAD; MOSMANN, 1994). Na infecção por *L. major*, um estudo mostrou que a inoculação local de anticorpos anti-TGF- β nas lesões leva a uma cura mais rápida, diminuição da carga parasitária sem alterar a produção de IFN- γ através do aumento da produção de NO (LI et al., 1999), sugerindo que esta citocina está associada a um papel regulador na fase crônica da LC.

Trabalhos recentes demonstraram que a administração prévia por via oral com *L. lactis* produtora de Hsp65 preveniu o desenvolvimento de artrite (GUSMAO-SILVA et al., 2020) e colite (GOMES-SANTOS et al., 2017) em camundongos, pela indução de células T regs CD4⁺LAP⁺ e CD4⁺Foxp3⁺ de maneira dependente de TLR2. Além destes trabalhos, um estudo recente do nosso grupo também demonstrou o aumento da frequência de células T regs CD4⁺LAP⁺ e CD4⁺Foxp3⁺ tanto nos linfonodos mesentéricos quanto nos linfonodos drenantes de animais tratados previamente com Hsp65 e infectados por *L. braziliensis* (GUERRA et al., 2021).

Estes trabalhos corroboram com os nossos dados que mostram o papel essencial na modulação da inflamação das células T regs CD4⁺LAP⁺ e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, estas parecem migrar do linfonodo mesentérico após administração com Hsp65 para a periferia, neste caso, o sítio da infecção (Figura 11). 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; WEINER, 2006).

Paralelamente, analisamos os aspectos histopatológicos das lesões através do escore inflamatório de cortes histológicos das orelhas dos animais tratados ou não com Hsp65. Nossos achados mostraram que o tratamento oral com Hsp65 parece promover uma diminuição da cronicidade da doença. Nas primeiras semanas de infecção após o tratamento oral (6 e 7 semanas), os animais do grupo Lb/Hsp parecem apresentar uma inflamação aguda seguida da diminuição da intensidade da inflamação nas últimas semanas de infecção (8, 9 e 10 semanas) (Figura 13).

Em relação a presença de macrófagos e células polimorfonucleares, também foi observado um discreto aumento destas células no infiltrado inflamatório das lesões dos animais tratados com Hsp65, seguido de um declínio nas últimas semanas de infecção (Figura 13). No entanto, em todos os parâmetros do escore inflamatório analisados, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

No modelo de leishmaniose experimental, o infiltrado dérmico agudo é constituído por neutrófilos e macrófagos. O recrutamento de neutrófilos associado à produção de IFN- γ restringe a replicação de parasita (BELKAID et al., 2001; VENUPRASAD; CHATTOPADHYAY; SAHA, 2003). Estes dados poderiam explicar a redução da carga parasitária a partir da 6^a semana após infecção observado nas orelhas e nos linfonodos drenantes dos animais tratados com Hsp65, desta forma acreditamos que o tratamento oral com Hsp65 após a infecção por *L. braziliensis* promoveu o controle do crescimento do parasita, sem causar danos teciduais (Figura 12 e 13).

O tratamento utilizando Hsps tem demonstrado seu potencial na preservação tecidual 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). O uso oral de Hsp65 diminuiu o dano endotelial da aorta caracterizado pela patogênese da aterosclerose (JING et al., 2011), assim como inibiu os sinais de inflamação na mucosa da animais com colite, preservando sua arquitetura e resultando apenas em um discreto infiltrado inflamatório (GOMES-SANTOS et al., 2017).

O balanço entre a produção de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias durante a ação da resposta imune é fundamental para controlar a infecção e atenuar os efeitos inflamatórios que levam a destruição tecidual, contribuindo para uma cicatrização mais acelerada da lesão característica na LC (MASPI; ABDOLI; GHAFFARIFAR, 2016). Desta forma, acreditamos que os efeitos apresentados pelos animais tratados com Hsp65 após a infecção por *L. braziliensis* são consequentes da maior produção de IL-10 acompanhado do aumento de IFN- γ nas últimas semanas pós-infecção, consequência da presença de células Tregs CD4⁺LAP⁺ e CD4⁺CD25⁺Foxp3 nos linfonodos drenantes da lesão, isto parece ter contribuído para a diminuição da inflamação, levando à uma proteção do dano tecidual e no controle da carga parasitária neste trabalho.

7 CONCLUSÃO

A utilização da indução da TO utilizando a proteína heteróloga Hsp65 apresenta boas perspectivas para seu emprego no tratamento da LC. Concluimos que o tratamento oral com *L. lactis* produtora de Hsp65 derivada da *M. leprae* após a infecção foi capaz de modular a inflamação causada por *L. braziliensis*. Desta forma, acreditamos que o uso da indução da tolerância oral por *L. lactis* produzindo Hsp65 pode ser considerado como uma estratégia terapêutica promissora não somente para doenças autoimunes, mas também para doenças inflamatórias causada por patógenos.

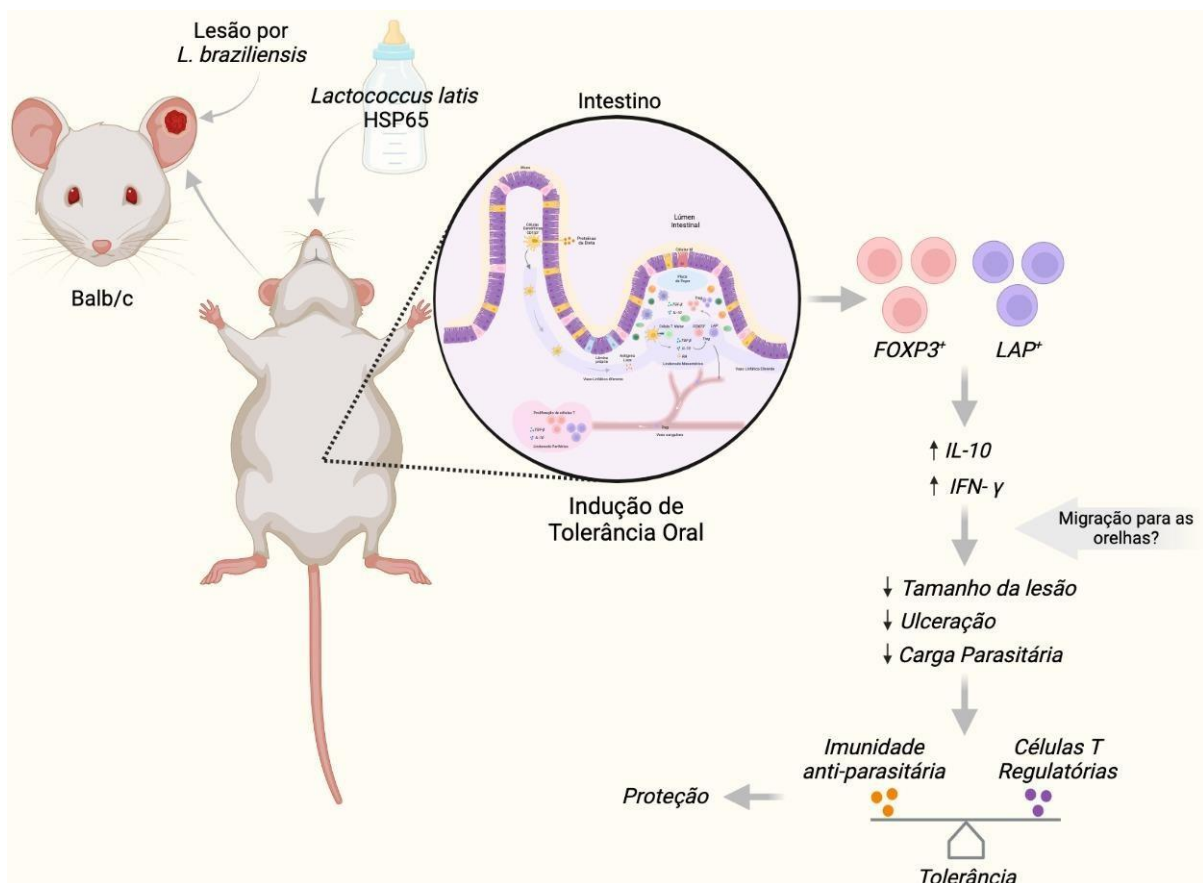


Figura 14 - Resumo gráfico da hipótese do trabalho e dos resultados. O tratamento oral utilizando *L. lactis* produtora de Hsp65 realizado após 4 semanas de infecção por *L. braziliensis* diminuiu os sinais de inflamação e o dano tecidual das lesões, com ausência de ulcerações. Este tratamento promoveu o desenvolvimento de lesões menores, reduziu e controlou a carga parasitária com 6 semanas de infecção nas orelhas e nos linfonodos drenantes da lesão. A utilização da *L. lactis*-Hsp65 como tratamento oral também foi capaz de induzir um balanço essencial entre citocinas pro-inflamatórias (IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-10), necessário para o controle da infecção sem causar danos teciduais. A tolerância induzida pelo tratamento oral com Hsp65 modulou a inflamação causada pela infecção, possivelmente através do aumento da frequência das células T regulatórias induzidas CD4⁺LAP⁺ e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ observado nos animais tratados com Hsp65.

Fonte: Elaborado pela autora

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho, a diminuição da inflamação observada nos animais tratados com Hsp65 está associada com a migração das células T regulatórias para os linfonodos drenantes da lesão causada por *L. braziliensis*. Este achado nos permite acreditar que estas células podem migrar também para a lesão. Por isso, novos experimentos já vêm sendo realizados para avaliar a frequência das células T regulatórias no sítio de inoculação (orelhas).

REFERÊNCIAS

- AGA, E. et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 169, n. 2, p. 898–905, 15 jul. 2002.
- AGUIAR, M. G. et al. Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1234–1240, 16 out. 2009.
- AKUFFO, H. et al. Responsiveness in diffuse versus local cutaneous leishmaniasis is due to parasite differences. **Scandinavian journal of immunology**, v. 26, n. 6, p. 717–721, 1987.
- ALBANI, S. et al. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. **Nature medicine**, v. 1, n. 5, p. 448–452, 1995.
- 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, maio 2011.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 35671, 2012.
- ANDROVITSANEA, A. et al. The pathophysiological role of heat shock response in autoimmunity: A literature review. **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2626, 1 out. 2021.
- ANTOINE, J. C. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 392–401, 1 out. 1998.
- ANTONELLI, L. R. V. et al. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 136, n. 2, p. 341, maio 2004.
- ANTONELLI, L. R. V. et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology letters**, v. 101, n. 2, p. 226–230, 15 nov. 2005.
- ANTONIOU, M. et al. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 30, p. 20540, 25 jul. 2013.
- ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, 19 jun. 2018.
- BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, dez. 2002.

BARRAL, A. et al. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **International journal of dermatology**, v. 34, n. 7, p. 474–479, 1995.

BARROSO, D. H. et al. PD-L1 May Mediate T-Cell Exhaustion in a Case of Early Diffuse Leishmaniasis Caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. may, 11 maio 2018.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10–3, p. 1097, ago. 2007.

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. **The Journal of experimental medicine**, v. 194, n. 10, p. 1497–1506, 19 nov. 2001.

BELKAID, Y. et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502–507, 5 dez. 2002.

BERTOLINI, T. B. et al. Role of orally induced regulatory T cells in immunotherapy and tolerance. **Cellular Immunology**. Academic Press Inc., 1 jan. 2021.

BILLINGHAM, R. E.; BRENT, L.; MEDAWAR, P. B. Actively acquired tolerance of foreign cells. **Nature**, v. 172, n. 4379, p. 603–606, 1953.

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.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 51–56, 1991.

BOGDAN, C. et al. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current opinion in immunology**, v. 8, n. 4, p. 517–525, 1996.

BOLOTIN, A. et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome research**, v. 11, n. 5, p. 731–753, maio 2001.

BORGES, J.; RAMOS, C. Protein folding assisted by chaperones. **Protein and peptide letters**, v. 12, n. 3, p. 257–261, 6 abr. 2005.

BOURREAU, E. et al. High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. **The Journal of infectious diseases**, v. 184, n. 12, p. 1628–1630, 15 dez. 2001.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. **Scandinavian journal of immunology**, v. 70, n. 6, p. 505–515, dez. 2009.

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

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 351–366, 6 fev. 1998.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**. Lancet Publishing Group, set. 2018.

CAMPOS, M. B. et al. Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. **PloS one**, v. 13, n. 3, 1 mar. 2018.

CARNEIRO, M. B. et al. Th1-Th2 Cross-Regulation Controls Early *Leishmania* Infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir. **Cell host & microbe**, v. 27, n. 5, p. 752- 768.e7, 13 maio 2020.

CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT 2012.

CARVALHOA, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, p. 315–325, 1994.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and immunity**, v. 67, n. 8, p. 3703–3713, 1999.

CASTRO-JUNIOR, A. B. et al. Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. **Cellular Immunology**, 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 microbiology**, v. 47, p. 45–61, 1 maio 2015.

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

CHEN, M. et al. High-dose heat shock protein gp96 immunization prevents type 1 diabetes via inducing regulatory T cells. **Chinese journal of biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 1685–1693, 25 dez. 2016.

CHEN, M.-L. et al. Latency-associated peptide identifies a novel CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell subset with TGFβ-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 180, n. 11, p. 7327–7337, 1 jun. 2008.

CHEN, Y. et al. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. **Nature**, v. 376, n. 6536, p. 177–180, 13 jul. 1995.

CHEN, Y. H.; WEINER, H. L. Dose-dependent activation and deletion of antigen-specific T cells following oral tolerance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 778, p. 111–121, 1996.

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.

COBELENS, P. M. et al. Dynamics of mycobacterial HSP65-induced T-cell cytokine expression during oral tolerance induction in adjuvant arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 41, n. 7, p. 775–779, 2002.

CONVIT, J. et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 444–448, 1 jul. 1993.

COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent mechanism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1757–1764, 6 ago. 2007.

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 Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e965, mar. 2011.

COSTA, J. M. L. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 319–323, 1 dez. 1986.

COSTA, J. M. L. Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 3–17, 2005.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A. et al. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. **Immunity**, v. 29, n. 1, p. 114–126, 18 jul. 2008.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, nov. 2009.

DE AZEVEDO, M. S. P. et al. Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 11, n. 2, p. 1146–1157, 2012.

DE FARIA, A. M. C. et al. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. **Mechanisms of ageing and development**, v. 102, n. 1, p. 67–80, 1 maio 1998.

DE KLEER, I. M. et al. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 10, p. 6435–6443, 15 maio 2004.

DE MAIO, A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 1999.

DE MORENO DE LEBLANC, A. et al. Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. **Gastroenterology research and practice**, v. 2015, 2015.

DE MOURA, T. R. et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827–5834, set. 2005.

DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKY, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, 2012.

DE OLIVEIRA GUERRA, J. A. et al. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e980, mar. 2011.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 2, p. 827–829, 1998.

DELGOBO, M. et al. **Gut: Key element on immune system regulation** *Brazilian Archives of Biology and Technology* Instituto de Tecnologia do Parana, , 2019.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 276, 2012.

EDEN, W. VAN et al. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. **Nature**, v. 331, n. 6152, p. 171–173, 1988.

ELIAS, D. et al. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 4, p. 1576–1580, 1990.

ELLIS, R. J. Molecular chaperones: the plant connection. **Science (New York, N.Y.)**, v. 250, n. 4983, p. 954–9, 16 nov. 1990.

ESTERHÁZY, D. et al. Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. **Nature**, v. 569, n. 7754, p. 126, 2 maio 2019.

FALCÃO, S. C. et al. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. **International Journal for Parasitology**, 42; 771-780, 2012.

FANGER JOANNE L VINEY, N. A.; MOWAT, A. M.; O, J. M. Induction of Oral Tolerance Expanding Dendritic Cells In Vivo Enhances the. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 5815–5825, 1998.

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

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. **Advances in immunology**, v. 73, n. 73, p. 153–264, 1999.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunological reviews**, v. 206, p. 232–259, ago. 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.

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, 1 set. 2007.

FOLLADOR, I. et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of Leishmania braziliensis infection. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34, n. 11, 2002.

GALLO, L. I. et al. The 90-kDa Heat-shock Protein (Hsp90)-binding Immunophilin FKBP51 Is a Mitochondrial Protein That Translocates to the Nucleus to Protect Cells against Oxidative Stress *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 34, p. 30152–30160, 26 ago. 2011.

GASBARRINI, G.; BONVICINI, F.; GRAMENZI, A. Probiotics History. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 50, p. S116–S119, 1 dez. 2016.

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

GAZE, S. T. et al. Mucosal Leishmaniasis Patients Display an Activated Inflammatory T-cell Phenotype Associated with a Nonbalanced Monocyte Population. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 63, p. 70–78, 2006.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in microbiology**, v. 161, n. 6, p. 480–487, jul. 2010.

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

GOMES-SILVA, A. et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human Leishmania (Viannia) braziliensis infection? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, n. 3, p. 440, set. 2007.

GROUX, H. et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, v. 389, n. 6652, p. 737–742, 1997.

GUERRA, P. V. et al. Oral Tolerance Induced by Heat Shock Protein 65-Producing Lactococcus lactis Mitigates Inflammation in Leishmania braziliensis Infection. **Frontiers in immunology**, v. 12, 24 jun. 2021.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 21 abr. 2009.

GULLO, C. A.; TEOH, G. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. **Immunology letters**, v. 94, n. 1–2, p. 1–10, 15 jun. 2004.

GUSMAO-SILVA, G. et al. Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Antigen-Induced Arthritis in Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 23 set. 2020.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911–926, 1 dez. 2015.

HANSEN, G. et al. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 105, n. 1, p. 61–70, 2000.

HARATS, D. et al. Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates *Mycobacterium tuberculosis*-induced and high-fat-diet-driven atherosclerotic lesions. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 7, p. 1333–1338, 2002.

HAUET-BROERE, F. et al. Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. Suppl 3, p. iii65, nov. 2006.

HIGGINS, P. J.; WEINER, H. L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. **The Journal of Immunology**, v. 140, n. 2, 1988.

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, 1 ago. 2007.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392–401, 1 maio 2016.

ISHIDA, Y. et al. Clinical effects of *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on perennial allergic rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 2, p. 527–533, 2005.

JINDAL, S. et al. Primary Structure of a Human Mitochondrial Protein Homologous to the Bacterial and Plant Chaperonins and to the 65-Kilodalton *Mycobacterium* Antigen. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 5, p. 2279–2283, 1989.

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, 31 maio 2011.

JOHNSON, B. R.; KLAENHAMMER, T. R. Impact of genomics on the field of probiotic research: historical perspectives to modern paradigms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 141, 2014.

JOHNSON, W. D. et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **The Journal of infectious diseases**, v. 156, n. 1, p. 73–83, 1987.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Publishing Group**, 2011.

KELSALL, B. Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. **Mucosal immunology**, v. 1, n. 6, p. 460–469, 2008.

KRAUS, T. A.; MAYER, L. Oral tolerance and inflammatory bowel disease. **Current opinion in gastroenterology**, v. 21, n. 6, p. 692–696, nov. 2005.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Rio de Janeiro**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LAOUAR, Y. et al. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. **Nature immunology**, v. 6, n. 6, p. 600–607, 2005.

LARA-SILVA, F. DE O. et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p. 128–136, 1 ago. 2015.

LAUFS, H. et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 826–835, 2002.

LEOPOLDO, P. T. G. et al. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 25 abr. 2006.

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 71–76, 1999.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual review of genetics**, 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. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 83, 2012.

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. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 7, p. 1187–1196, 3 abr. 2000.

MACHADO, P. R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438–444, ago. 2011.

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.

MARQUES-DA-SILVA, C. et al. Intralesional uridine-5'-triphosphate (UTP) treatment induced resistance to *Leishmania amazonensis* infection by boosting Th 1 immune responses and reactive oxygen species production. **Purinergic Signalling**, v. 14, p. 201–211, 2018.

MARSDEN, P. D. et al. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis* skin ulcers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 561–562, 1 jan. 1984.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 859–876, 1986.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Tres Bracos, Bahia-Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 2, p. 93–101, 1994.

MARTIN, J.; HARTL, F. U. Protein folding in the cell: molecular chaperones pave the way. **Structure**, v. 1, n. 3, p. 161–164, 15 nov. 1993.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 17 ago. 2016.

MAZZINI, E. et al. Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1⁺ macrophages to CD103⁺ dendritic cells. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 248–261, 20 fev. 2014.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological reviews**, v. 201, p. 206–224, out. 2004.

MEDZHITOV, R.; SCHNEIDER, D. S.; SOARES, M. P. Disease tolerance as a defense strategy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 335, n. 6071, p. 936–941, 24 fev. 2012.

MENDEZ, S. et al. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 2, p. 201–210, 19 jul. 2004.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 1, p. 421–425, 1992.

MILLER, A.; LIDER, O.; WEINER, H. L. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 4, p. 791–798, 1 out. 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. **Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**, 2017. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2021

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância em Saúde no Brasil 2003-2019 Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 50, p. 1–154, 2019.

MIYOSHI, A. et al. A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. **FEMS Microbiology letters**, v. 239, n. 2, p. 205–212, 15 out. 2004.

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

MOWAT, A. M. I. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 4, p. 331–341, 2003.

MOWAT, A. M. I. To respond or not to respond - a personal perspective of intestinal tolerance. **Nature reviews. Immunology**, v. 18, n. 6, p. 405–415, 1 jun. 2018.

MUCIDA, D. et al. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 7, p. 1923–1933, jul. 2005.

MUCIDA, D.; CHEROUTRE, H. TGF β and Retinoic Acid Intersect in Immune-Regulation. **Cell Adhesion & Migration**, v. 1, n. 3, p. 142, 2007.

MUCIDA, D.; PARK, Y.; CHEROUTRE, H. From the diet to the nucleus: Vitamin A and TGF- β join efforts at the mucosal interface of the intestine. **Seminars in immunology**, v. 21, n. 1, p. 14, fev. 2009.

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. **The Journal of experimental medicine**, v. 194, n. 5, p. 629–644, 3 set. 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. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 2, p. 151–158, 17 jul. 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. **Parasitology**, v. 87 (Pt 1), n. 1, p. 7–13, 1983.

NETEA, M. G. et al. A guiding map for inflammation Europe PMC Funders Group. **Nat Immunol**, v. 18, n. 8, p. 826–831, 2017.

NILSEN, R.; HANA, R. N. In situ characterization of the cutaneous immune response in Ethiopian cutaneous leishmaniasis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 26, n. 5, p. 503–512, 1987.

OCHI, H. et al. Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+ CD25- LAP+ T cells. **Nature medicine**, v. 12, n. 6, p. 627–635, jun. 2006.

OIDA, T. et al. CD4⁺CD25⁻ T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4⁺CD45RB^{high}-induced colitis by a TGF- β -dependent mechanism. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 5, p. 2516–2522, 1 mar. 2003.

OIDA, T.; WEINER, H. L. TGF- β Induces Surface LAP Expression on Murine CD4 T Cells Independent of Foxp3 Induction. **PLOS ONE**, v. 5, n. 11, p. e15523, 2010.

PABST, O.; BERNHARDT, G. On the road to tolerance--generation and migration of gut regulatory T cells. **European journal of immunology**, v. 43, n. 6, p. 1422–1425, jun. 2013.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 1 nov. 2014.

PAHO/WHO. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 30 ago. 2021.

PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology** 2014 14:5, v. 14, n. 5, p. 289–301, 11 abr. 2014.

PEARSON, R. D.; DE QUEIROZ SOUSA, A. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. v. 22, n. 1, p. 1–11, 1996.

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 pathogens**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2014.

PINTO-DA-SILVA, L. H. et al. Leishmania (Viannia) braziliensis metacyclic promastigotes purified using Bauhinia purpurea lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. **International journal for parasitology**, v. 32, n. 11, p. 1371–1377, out. 2002.

PONTES, D. S. et al. Lactococcus lactis as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. **Protein expression and purification**, v. 79, n. 2, p. 165–175, out. 2011.

PORROZZI, R. et al. Cross-immunity experiments between different species or strains of leishmania in rhesus macaques (macaca mulatta). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 297–305, 1 set. 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 Anti-Ergotopic Regulatory T Cells. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, p. 4026, 24 dez. 2008.

QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. The HSP60 immune system network. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 2, p. 89–95, 2011.

RÅBERG, L.; GRAHAM, A. L.; READ, A. F. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1513, p. 37–49, 2009.

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 (London, England)**, v. 358, n. 9295, p. 1749–1753, 24 nov. 2001.

READ, A. F.; GRAHAM, A. L.; RÅBERG, L. Animal defenses against infectious agents: is damage control more important than pathogen control. **PLoS biology**, v. 6, n. 12, p. 2638–2641, dez. 2008.

READ, P. D. FACTORS AFFECTING EGG PRODUCTION OF LABORATORY-BRED LUTZOMYIA LONGIPALPIS (DIPTERA: PSYCHODIDAE)1. **J. Med. Entomol**, v. 16, n. 5, p. 413–423, 1979.

REID, G. et al. Potential uses of probiotics in clinical practice. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 4, p. 658–672, out. 2003.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, set. 2007.

RETHI, B.; EIDSMO, L. FasL and TRAIL signaling in the skin during cutaneous leishmaniasis - implications for tissue immunopathology and infectious control. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, 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.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143–148, 1998.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P. et al. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, 27 jun. 2016.

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

ROHOŠOVÁ, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. <http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2006.022.html>, v. 53, n. 3, p. 161–171, 2013.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, nov. 2002.

SACRAMENTO, L. A. et al. Toll-Like Receptor 2 Is Required for Inflammatory Process Development during *Leishmania infantum* Infection. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n. FEB, 23 fev. 2017.

SAD, S.; MOSMANN, T. R. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 153, n. 8, 1994.

SALHI, A. et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 9, p. 6139–6148, 1 maio 2008.

SAMBORSKI, P.; GRZYMISŁAWSKI, M. The Role of HSP70 Heat Shock Proteins in the Pathogenesis and Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University**, v. 24, n. 3, p. 525–530, 1 maio 2015.

SCHMITT, E. et al. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 1, p. 15–27, jan. 2007.

SCHNEIDER, D. S.; AYRES, J. S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 11, p. 889–895, nov. 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. **Current Opinion in Infectious Diseases**, out. 2008.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**. MDPI AG, 18 jun. 2017.

SCOTT, C. L.; AUMEUNIER, A. M.; MOWAT, A. M. I. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? **Trends in immunology**, v. 32, n. 9, p. 412–419, set. 2011.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature reviews. Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 25 ago. 2016.

SESAB. Boletim Epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar do Estado da Bahia. **Secretaria de Saúde do Governo do Estado da Bahia**, nº1, 2020.

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.

SILVEIRA, F. T. et al. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1075–1080, 1 nov. 2008.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–431, 1 ago. 2009.

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

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. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 4, p. 1109–1113, 2002.

SRIVASTAVA, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology** 2002 2:3, v. 2, n. 3, p. 185–194, 2002.

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. **Infection and immunity**, v. 66, n. 7, p. 3183–3189, 1998.

STEIDLER, L. et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. **Science (New York, N.Y.)**, v. 289, n. 5483, p. 1352–1355, 25 ago. 2000.

STETLER, R. A. et al. Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 92, n. 2, p. 184–211, out. 2010.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International journal of food microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1–29, 29 abr. 1997.

TASEW, G. et al. Systemic FasL and TRAIL neutralisation reduce leishmaniasis induced skin ulceration. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 10, out. 2010.

TUKAJ, S.; KAMINSKI, M. Heat shock proteins in the therapy of autoimmune diseases: too simple to be true? **Cell Stress & Chaperones**, v. 24, n. 3, p. 475, 1 maio 2019.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1829–1863, 2002.

VAN DEN BROEK, M. F. et al. Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 2, p. 449–466, 1989.

VAN EDEN, W.; VAN DER ZEE, R.; PRAKKEN, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 4, p. 318–330, abr. 2005.

VAN EDEN, W.; WAKSMAN, B. H. Immune regulation in adjuvant-induced arthritis: possible implications for innovative therapeutic strategies in arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 48, n. 7, p. 1788–1796, 1 jul. 2003.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 1 dez. 2004.

VANDENBROUCKE, K. et al. Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. **Mucosal Immunology** 2010 3:1, v. 3, n. 1, p. 49–56, 30 set. 2009.

VAZ, N. M. et al. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 60, n. 2, p. 110–115, 1977.

VAZ, N. M. et al. Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 1, p. 83–91, 1981.

VENUPRASAD, K.; CHATTOPADHYAY, S.; SAHA, B. CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. **Human immunology**, v. 64, n. 1, p. 38–43, 1 jan. 2003.

VIEIRA, M. G. S. et al. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 979–983, 2002.

VON HERRATH, M. G.; DYRBERG, T.; OLDSTONE, M. B. A. Oral insulin treatment suppresses virus-induced antigen-specific destruction of beta cells and prevents autoimmune diabetes in transgenic mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 6, p. 1324, 15 set. 1996.

WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 71, n. 7, p. 1245–1263, 13 nov. 2014.

WALLIN, R. P. A. et al. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. **Trends in immunology**, v. 23, n. 3, p. 130–135, 1 mar. 2002.

WANG, L. et al. Connecting blood and intratumoral Treg cell activity in predicting future relapse in breast cancer. **Nature Immunology** 2019 20:9, v. 20, n. 9, p. 1220–1230, 8 jul. 2019.

WEGMANN, U. et al. Complete Genome Sequence of the Prototype Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 8, p. 3256, abr. 2007.

WEINER, H. L.; WU, H. Y. Oral tolerance. **Immunologic research**, v. 241, n. 3, p. 241–259, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leishdis1.html>>. Acesso em: 30 ago 2021.

WHO. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly epidemiological record**, v. 95, p. 265–280, 19 jun. 2020.

WORBS, T. et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 3, p. 519, 20 mar. 2006.

YOSHINO, S.; QUATTROCCHI, E.; WEINER, H. L. Suppression of antigen-induced arthritis in lewis rats by oral administration of type ii collagen. **Arthritis & Rheumatism**, v. 38, n. 8, p. 1092–1096, 1 ago. 1995.

ZAMBRANO-VILLA, S. et al. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 6, p. 272–278, 1 jun. 2002.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. **FASEB jornal: Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 11, p. 1567–1569, 2003.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 174, n. 6, p. 3227–3236, 15 mar. 2005.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 7, p. 2022–2032, 3 jul. 2006.

ZHANG, Z. J. et al. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 22, p. 10252–10256, 1991.