



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOTECNOLOGIA

HOZANY PRAXEDES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE LINFÓCITOS B NA  
INFECÇÃO POR *LEISHMANIA AMAZONENSIS*  
ENTRE ANIMAIS SUSCETÍVEIS E PARCIALMENTE RESISTENTE.**

Rio de Janeiro  
2023

HOZANY PRAXEDES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE LINFÓCITOS B NA  
INFEÇÃO POR *LEISHMANIA AMAZONENSIS*  
ENTRE ANIMAIS SUSCETÍVEIS E PARCIALMENTE RESISTENTE.**

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro  
como requisito necessário para a obtenção do título de Bacharel  
em Ciências Biológicas: Biotecnologia.

Orientador: Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes

Co-orientador: Msc. Júlio Souza Santos

## CIP - Catalogação na Publicação

P919a Praxedes, Hozany  
Avaliação do perfil fenotípico de Linfócitos B na  
infecção por *Leishmania amazonensis* entre animais  
suscetíveis e parcialmente resistentes / Hozany  
Praxedes. -- Rio de Janeiro, 2023.  
52 f.

Orientador: Herbert Guedes.

Coorientador: Júlio Souza.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus  
Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Bacharel  
em Ciências Biológicas: Biotecnologia, 2023.

1. Linfócito B. 2. Imunologia. 3. *Leishmania*  
*amazonensis*. 4. Interleucina 10. 5. Anticorpos. I.  
Guedes, Herbert, orient. II. Souza, Júlio ,  
coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**HOZANY PRAXEDES DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE LINFÓCITOS B NA  
INFEÇÃO POR *LEISHMANIA AMAZONENSIS*  
ENTRE ANIMAIS SUSCETÍVEIS E PARCIALMENTE RESISTENTE.**

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito necessário para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia.

Aprovada em 14 de Julho de 2023.



---

(Herbert Leonel de Matos Guedes, Doutor, UFRJ.)

 Documento assinado digitalmente  
DEBORA DECOTE RICARDO DE LIMA  
Data: 11/09/2023 08:42:46-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

(Débora Decoté Ricardo de Lima, Doutora, UFRJ.)

 Documento assinado digitalmente  
RAPHAEL DO CARMO VALENTE  
Data: 12/09/2023 13:04:49-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

(Raphael do Carmo Valente, Doutor, UFRJ.)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por tudo o que tens feito por mim desde o início até aqui, pela proteção, saúde, sabedoria e cuidado.

Agradeço também aos meus pais Hosana e Gessé por todo apoio e incentivo em todos esses anos, sou grata pelo esforço em sempre buscar o melhor para mim.

Agradeço ao meu marido Lucas por cada palavra de encorajamento e força nos momentos mais difíceis, por todo amor, carinho e confiança que me ajudaram a permanecer no foco.

Agradeço também ao meu irmão Rômulo e minha melhor amiga Rayana por estarem sempre comigo e por terem comemorado cada mini vitória do começo até aqui.

Agradeço também a minha avó Maria por cada oração e cada conselho, por sempre me motivar a correr atrás dos meus sonhos e lembrar do meu potencial.

Agradeço também ao meu tio Walci por toda ajuda e pela confiança e agradeço a toda a minha família pelo apoio.

Sou grata também por cada amigo que fez parte dessa trajetória, estudando, incentivando e ajudando.

Agradeço também ao meu orientador Herbert Guedes pela confiança e por todo aprendizado nesses anos, ao meu co-orientador Júlio Souza pelos conselhos e por toda ajuda nos experimentos.

Agradeço a toda equipe do laboratório de Imunobiotecnologia que me ajudou em meus experimentos.

Agradeço também aos membros da banca e minha revisora por aceitarem fazer parte dessa etapa final.

**Ebenézer, até aqui nos ajudou o Senhor.**

## RESUMO

Ao longo dos anos, estudos associaram o linfócito B a patogênese em leishmanioses. No presente trabalho, procuramos entender as respostas de linfócitos B entre os modelos suscetível (BALB/c) e parcialmente resistentes à infecção (C57BL/6) por *L. amazonensis*. Para isso, infectamos ambos os modelos com parasitas de *L. amazonensis* na orelha e observamos a progressão da lesão. Após 38 dias de infecção, período onde as lesões de ambos os modelos C57BL/6 e BALB/c estavam começando a apresentar diferença estatística em relação ao tamanho, foi observada carga parasitária igual na orelha e no linfonodo drenante, porém, não foi observada carga parasitária no baço. Após 59 dias, período onde os animais BALB/c apresentavam lesões maiores que os animais C57BL/6, a carga parasitária também foi superior ao modelo C57BL/6 no linfonodo e na orelha e mais uma vez o baço não apresentou carga parasitária. Através da técnica de citometria de fluxo, avaliamos algumas populações celulares de linfócitos B no linfonodo drenante e na orelha. No linfonodo, após 38 dias, animais susceptíveis à infecção (BALB/c) apresentaram níveis maiores de linfócitos B no centro germinativo e linfócitos B que produzem IL-10 e expressam PD-L1 que animais parcialmente resistentes à infecção (C57BL/6). Não houve diferença entre os grupos nos níveis de linfócitos B totais, linfócitos B que expressam CD1d e TIM-3. Após 59 dias, animais BALB/c apresentaram no linfonodo níveis de linfócitos B totais e linfócitos B que expressam CD1d menores que animais C57BL/6, porém níveis maiores de linfócitos B do centro germinativo. Não houve diferença entre os modelos nos níveis de linfócitos B que expressam TIM-3, PD-L1 e produziam IL-10 no linfonodo. Em relação ao sítio da lesão, não foram observadas diferenças nos níveis dessas populações após 38 e 59 dias. Também realizamos um ELISA para quantificação de anticorpos e observamos que não houve diferença na produção de IgG, IgG2a, IgG2b, IgE e IgA entre os grupos. Animais BALB/c apresentaram maior produção de IgG1 e IgM que animais C57BL/6, mas apresentaram uma menor produção de IgG2c em comparação com os C57BL/6. Além disso, infectamos animais C57BL/6 WT, IL-10<sup>-/-</sup> (knockout), animais que não produzem a IL-10 e animais  $\mu$ MT, que são deficientes em linfócitos B, para entender o perfil da lesão e entender se este linfócito está associado com a progressão da lesão no modelo parcialmente resistente. Observamos que o linfócito B nos animais C57BL/6 não parece participar do desenvolvimento da lesão e carga parasitária, porém também não está diretamente associado a resolução das lesões e carga parasitária neste modelo, por outro lado, a IL-10 parece ser importante para o controle da lesão e carga parasitária no C57BL/6. Juntos, nossos dados

demonstram que a produção de IgG1 pode estar associada à patogênese no BALB/c, pois neste modelo o linfócito B produz níveis maiores deste isotipo e no modelo parcialmente resistente (C57BL/6) níveis menores e a produção de IgG2c pode estar associada com o melhor prognóstico da doença já que o animal C57BL/6 tem uma produção maior e o BALB/c uma produção menor.

**Palavras-chave:** leishmaniose; linfócito B; anticorpo; IL-10.

## ABSTRACT

Over the years, studies have associated B lymphocytes with the pathogenesis of leishmaniasis. In the present work, we tried to understand the responses of B lymphocytes between susceptible (BALB/c) and partially resistant (C57BL/6) models to infection by *L. amazonensis*. For this, we infected both models with *L. amazonensis* parasites in the ear and observed the progression of the lesion. After 38 days of infection, a period in which the lesions of both C57BL/6 and BALB/c models were starting to show statistical difference in terms of size, an equal parasite load was observed in the ear and in the draining lymph node, however, no load was observed in the spleen. After 59 days, a period in which the BALB/c animals had larger lesions than the C57BL/6 animals, the parasite load was also higher than the C57BL/6 model in the lymph node and ear, and once again the spleen did not show a parasite load. Through the flow cytometry technique, we evaluated some cell populations of B lymphocytes in the draining lymphnode and in the ear. In the lymphnode, after 38 days, animals susceptible to infection (BALB/c) showed higher levels of B lymphocytes in the germinal center and B lymphocytes that produce IL-10 and express PD-L1 than animals partially resistant to infection (C57BL/6). There was no difference between groups in levels of total B lymphocytes, B lymphocytes expressing CD1d and TIM-3. After 59 days, BALB/c animals showed lower levels of total B lymphocytes and B lymphocytes that express CD1d than C57BL/6 animals in the lymph node, but higher levels of B lymphocytes in the germinal center. There was no difference between the models in the levels of B lymphocytes that express TIM-3, PD-L1 and produce IL-10 in the lymph node. Regarding the lesion site, no differences were observed in the levels of these populations after 38 and 59 days. We also performed an ELISA for antibody quantification and observed that there was no difference in the production of IgG, IgG2a, IgG2b, IgE and IgA between groups. BALB/c animals showed higher production of IgG1 and IgM than C57BL/6 animals, but showed a lower production of IgG2c compared to C57BL/6. Furthermore, we infected C57BL/6 WT, IL-10 *-/-* (knockout) animals, animals that do not produce IL-10 and  $\mu$ MT animals, which are deficient in B lymphocytes, to understand the lesion profile and understand whether this lymphocyte is associated with lesion progression in the partially resistant model. We observed that the B lymphocyte in C57BL/6 animals does not seem to participate in the development of the lesion and parasite load, but it is also not directly associated with the resolution of lesions and parasite load in this model, on the other hand, IL-10 seems to be important for the lesion control and parasite load in C57BL/6.



Together, our data demonstrate that IgG1 production may be associated with pathogenesis in BALB/c, as in this model the B lymphocyte produces higher levels of this isotype and in the partially resistant model (C57BL/6) lower levels and IgG2c production may be associated with a better prognosis of the disease since the C57BL/6 animal has a higher production and the BALB/c a lower production.

**Key words:** leishmaniasis; B lymphocyte; antibody, IL-10.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo da leishmaniose .....	13
Figura 2 - Acompanhamento da progressão da lesão e quantificação da carga parasitária após 38 dias de infecção por <i>L. amazonensis</i> em animais BALB/c e C57BL/6 .....	23
Figura 3 - Acompanhamento da progressão da lesão e quantificação da carga parasitária após 59 dias de infecção por <i>L. amazonensis</i> em animais BALB/c e C57BL/6 .....	24
Figura 4 - Animais BALB/c apresentam maior proporção de linfócitos B no centro germinativo e linfócitos B produtores de IL-10 no linfonodo que animais C57BL/6 .....	26,27
Figura 5 - Animais BALB/c e C57BL/6 não apresentaram diferença em níveis e número de linfócitos B totais na orelha, linfócitos B produtores de IL-10, PDL-1, CD1d e TIM-3. ....	28
Figura 6 - C57BL/6 apresentaram diferença em proporção e número de linfócitos B totais e linfócitos B produtores CD1d+ no linfonodo drenante em comparação a animais C57BL/6, porém menor nível de linfócitos B de centro germinativo. ....	30,31
Figura 7 – Animais BALB/c e C57BL/6 não apresentaram diferenças na proporção de linfócitos B totais na orelha, linfócitos B produtores de IL-10 e que expressam PDL-1 e CD1d. ....	32
Figura 8 - Animais BALB/c apresentaram níveis maiores de IgM e IgG1 que animais C57BL/6, porém níveis menores de IgG2c .....	33,34
Figura 9 - Acompanhamento da progressão da lesão e quantificação da carga parasitária após a infecção por <i>L. amazonensis</i> em animais $\mu$ MT e IL-10 -/ .....	35
Tabela 1 – Resumo dos resultados encontrados .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

Th1 – “T helper 1”

Th2 – “T helper 2”

IFN- $\gamma$  – Interferon-gama

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, Tumor Necrosis Factor)

IL – Interleucina

SFB – Soro fetal bovino

M199 – Meio 199

LDA – Ensaio de diluição limitante (do inglês, Limited Dillution Assay)

LCL – Leishamniose cutânea localizada

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LM – Leishmaniose de mucosa

LV – Leishmaniose visceral

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

CD1d – Cluster de diferenciação ( do inglês, cluster of differentiation)

PD-L1 - Ligante de morte programada 1 ( do inglês, Programmed-Death Ligand 1)

TIM-3 - Domínios de mucina e imunoglobulina de célula T – 3

TIM-1 - Domínios de mucina e imunoglobulina de célula T – 1

Ig – Imunoglobulina

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 - <b>Leishmanioses</b> .....	12
1.2 - Formas clínicas.....	13
1.2.1 – Leishmaniose tegumentar americana.....	13
1.2.1.1 - Leishmaniose cutânea localizada.....	14
1.2.1.2 – Leishmaniose cutânea difusa.....	14
1.2.1.3 – Leishmaniose de mucosa.....	14
1.2.2 – Leishmaniose visceral.....	15
1.3 – Terapias disponíveis.....	15
1.4 – Resposta imune à infecção por <i>Leishmania</i> .....	16
<b>2 - Linfócito B</b> .....	17
2.1 – Linfócito B na leishmaniose.....	18
<b>3 - HIPÓTESE</b> .....	19
<b>4 - OBJETIVOS</b> .....	19
4.1 - Objetivo Principal.....	19
4.2 - Objetivos específicos.....	19
<b>5 – METODOLOGIA</b> .....	19
5.1 - Animais.....	19
5.2 - Infecção <i>in vivo</i> .....	19
5.3 - Acompanhamento da lesão.....	20
5.4 - Determinação da carga parasitária.....	20
5.5 - ELISA para a detecção de anticorpos.....	21
5.6 - Citometria de fluxo.....	21
5.7 – Análise e estatística.....	22
<b>6 - RESULTADOS</b> .....	22
6.1 - Animais BALB/c apresentam maior lesão que animais C57BL/6 38 dias após a infecção, porém os grupos não apresentam diferença na carga parasitária.....	22
6.2 - Animais BALB/c apresentam maior lesão que animais C57BL/6 59 dias após a infecção e os grupos apresentam diferença na carga parasitária.....	24
6.3 - Animais BALB/c apresentaram maior proporção de linfócitos B no centro germinativo e linfócitos B produtores de IL-10 no linfonodo após 38 dias de infecção do que animais C57BL/6.....	25

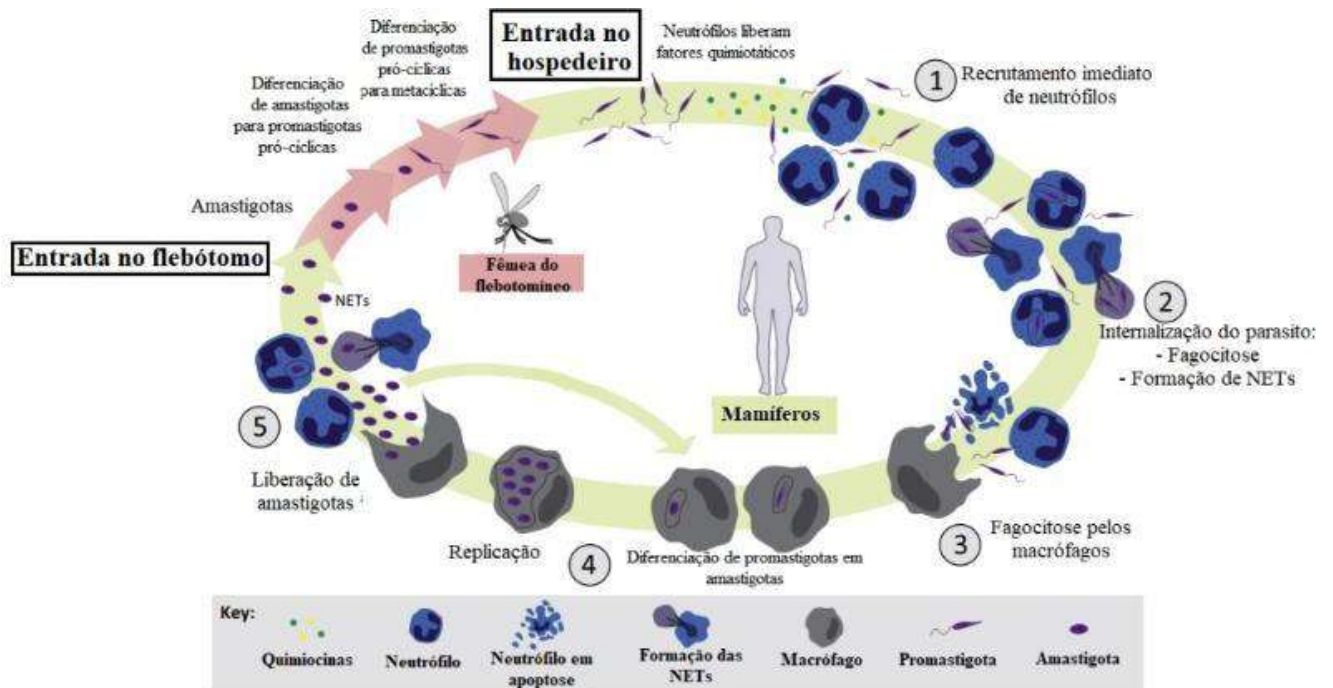
6.4 - Animais BALB/c e C57BL/6 não apresentaram diferenças na proporção e no número de linfócitos B totais, que expressam CD1d, PDL-1, TIM-3 e produzem IL-10 na orelha após 38 dias de infecção .....	27
6.5 - Animais C57BL/6 apresentam maior proporção e número de células B totais e B que expressam CD1d, porém menor proporção de células B de centro germinativo nos linfonodos drenantes após 59 dias .....	29
6.6 - Animais BALB/c e C57BL/6 não apresentaram diferenças na proporção de linfócitos B totais, que expressam CD1d, PDL-1 e produzem IL-10 na orelha após 59 dias.....	31
6.7 - Animais BALB/c apresentaram níveis maiores de IgM e IgG1 que animais C57BL/6, porém níveis menores de IgG2c .....	33
6.8 - O linfócito B não parece ser importante na infecção de animais C57BL/6, mas a IL-10 parece ser importante para controlar lesão e carga .....	34
<b>7 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>8 - CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais negligenciadas, caracterizada por apresentar diferentes formas clínicas, sendo as mais comuns a leishmaniose cutânea, que afeta a pele, e a visceral, que afeta os órgãos internos como fígado, baço e medula óssea. A forma cutânea da doença é a mais comum, a visceral é a mais grave e a de mucosa é a que causa maior prejuízo tecidual ao hospedeiro. Mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para as leishmanioses em aproximadamente 90 países ou territórios ao redor do mundo (OMS, 2023). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose cutânea é endêmica em vários países e é uma das seis doenças que requerem medidas urgentes de controle. Ademais, a OMS destaca que no Projeto Global de Leishmaniose de 2020, em janeiro daquele mesmo ano, 95% dos casos dessa forma da doença ocorreram nas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Além disso, mais de 85% dos novos casos de leishmaniose cutânea ocorreram em países como Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Líbia, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria e Tunísia. No Brasil, a taxa de casos permaneceu entre 13 e 18 por 100.000 habitantes nos últimos sete anos (OMS, 2020; MOHAMMADBEIGI ET AL., 2020). Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam duas principais formas ao longo do seu ciclo de vida, são elas: amastigotas e promastigotas. A forma amastigota está relacionada com a infecção intracelular e a forma promastigota está associada com a infecção extracelular (PESSÔA. S; MARTINS 1982). O ciclo de transmissão dos parasitos de *Leishmania* se inicia a partir do repasto sanguíneo de um hospedeiro invertebrado infectado para um hospedeiro vertebrado não infectado. Parasitos de *Leishmania* na forma promastigota metacíclica presentes na saliva do hospedeiro invertebrado são transferidos pelo inseto na região onde está ocorrendo o repasto. As células do sistema imunológico do hospedeiro, como macrófagos e neutrófilos, logo chegam ao sítio da picada e fagocitam os parasitos (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009; UNANUE; ALLEN, 1978) que se diferenciam para sua forma amastigota no seu interior. Essas células se tornam então infectadas e com a proliferação das formas amastigotas, acabam rompendo e liberando essas formas, que serão fagocitadas por outros macrófagos e neutrófilos, o que conseqüentemente favorece a continuidade à infecção. O ciclo termina quando o inseto segue para o repasto sanguíneo em

um hospedeiro vertebrado não infectado. Todo esse processo descrito pode ser observado na figura 1. (HURRELL et al, 2016).



**Figura 1 - Ciclo da leishmaniose.** Representação do ciclo da leishmaniose demonstrando as fases promastigota (em seres invertebrados) e amastigota (em seres vertebrados). Adaptado de HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016.

A infecção desencadeia uma série de manifestações clínicas que serão abordadas em seguida.

## 1.2 - Formas clínicas

### 1.2.1 - Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar ou cutânea é uma forma clínica que afeta a pele. Ela pode ser dividida entre leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose de mucosa (LM).

#### 1.2.1.1 - Leishmaniose cutânea localizada

A leishmaniose cutânea localizada é a forma mais comum das leishmanioses e é definida por lesões com úlceras ao redor do sítio da infecção. Áreas expostas da pele são considerados os sítios principais da infecção (VON STEBUT, 2015). A LCL não leva a morte, mas pode causar marcas estéticas, conseqüentemente pode levar à desigualdade social (BENNIS et al., 2017) e impactos psicológicos (YANIK et al., 2004). Durante a leishmaniose cutânea localizada, há uma mistura de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias nos tecidos com a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos TCD4 juntamente com TNF- $\alpha$  agindo controlando a divisão dos parasitas, portanto ajudando na resolução da infecção (ANTONELLI et al., 2004). Células B, macrófagos e células T reguladoras através da produção de IL-10 regulam a resposta induzida por IFN- $\gamma$  (GAAFAR et al., 1999; BOURREAU et al., 2002; GOMES-SILVA et al., 2007; RONET et al., 2010). As espécies responsáveis por causar a LCL são *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. mexicana*, *L. donovani* e *L. tropica* (MORAES, M et al., 1994; CANCHÉ-POOL, E et al., 2022; SHARMA, N et al., 2005 ).

### **1.2.1.2 - Leishmaniose cutânea difusa**

A leishmaniose cutânea difusa é a forma mais rara das leishmanioses. É caracterizada por diversas lesões que não são ulceradas, mas estão distribuídas pelo corpo do hospedeiro vertebrado (SOONG; HENARD; MELBY, 2012). É caracterizada pela ausência de resposta efetora anti-*Leishmania*, resultando na falta de respostas celulares específicas contra o parasito (SCOTT; NOVAIS, 2016). A LCD é caracterizada também pela expansão de linfócitos B, alta produção de IL-10 e anticorpos no soro (SCOTT; NOVAIS, 2016). Neste caso, os altos níveis de anticorpos podem ser correlacionados à quantidade de parasitas encontrados nos linfonodos (SCOTT; NOVAIS, 2016). Vale ressaltar que nas américas os parasitos responsáveis por causar a LCD são *L. amazonensis* e *L. mexicana* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

### **1.2.1.3 - Leishmaniose de mucosa**

A leishmaniose de mucosa é, por sua vez, caracterizada por lesões destrutivas na região do nariz, dos lábios e palatos, além de apresentar uma resposta imunopatológica forte (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Esta forma pode levar a morte e a desfiguração do hospedeiro permanentemente (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Na LM, a resposta imunológica é majoritária do tipo 1, com presença de células T citotóxicas e ação de citocinas inflamatórias



que vai resultar na diminuição de parasitos nas lesões e destruição tecidual (SCOTT; NOVAIS, 2016). A principal espécie relacionada a LM é a *L. brasilienses*, mas é possível encontrar LM causada por *L. amazonensis*.

### **1.2.2 - Leishmaniose visceral**

A leishmaniose visceral é uma forma crônica e sistêmica, caracterizada por sintomas como febre constante, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e perda de peso (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Os anticorpos séricos na LV são específicos contra *Leishmania*, mas também são autoimunes (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). *L. infantum* e *L. donovani* são exemplos de espécies responsáveis pela forma visceral. (SAINI P et al., 2020; PAUL D READY 2014)

### **1.3 – Tratamentos disponíveis**

Existe uma necessidade de desenvolver novas terapias, pois os tratamentos para as leishmanioses são os mesmos a muitos anos. Os antimonialis pentavalentes são drogas que causam dor, podem ter efeitos cardiotoxicos e causar arritmia (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Outros medicamentos como miltefosina e paramomicina são indicados como alternativas para o tratamento de leishmanioses (DORLO et al., 2012). Apesar desses tratamentos estarem disponíveis, eles apresentam pontos desestimulantes como dor, necessidade de ir várias vezes ao médico, receber tratamento em um curto período de tempo e alta citotoxicidade. Outra alternativa para tratamento dessas doenças seriam as vacinas, porem, atualmente existem apenas alguns modelos de vacinas disponíveis para cães. Podemos destacar as vacinas de primeira geração, que são constituídas de parasitas inteiramente mortos, antígeno fracionado de *Leishmania* e parasitas vivos atenuados. Também podemos citar as de segunda geração, que são constituídas de proteínas recombinantes derivadas de células geneticamente modificadas, além disso, também existem as vacinas de terceira geração, as vacinas de DNA (MOAFI, M et al 2019). Dados prévios do nosso grupo demonstram a eficácia da vacina intranasal de LaAg em camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*, o mecanismo de proteção foi associado com a produção aumentada de IFN- $\gamma$  e a vacinação levou a fases agudas e crônicas mais brandas da doença (Pratti, JES et al., 2016). Porém, apesar de existirem diversos exemplos de vacinas contra a leishmaniose, não existem vacinas aprovadas

para o uso em humanos. Os problemas encontrados nos tratamentos disponíveis e a ausência de uma vacina aprovada para humanos, traz luz a necessidade de mais esforços para entender a imunobiologia das leishmanioses e, assim, traçar alvos para o combate desta doença.

#### **1.4 - Resposta Imune à infecção por *Leishmania* sp.**

Durante a infecção, células residentes do tecido infectado iniciam uma resposta imunitária contra o patógeno, após isso, neutrófilos chegam ao local e fagocitam os parasitos os capturando e matando através das NETs (redes extracelulares de neutrófilos) (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009). Depois dos neutrófilos, os macrófagos e as células dendríticas fagocitam os parasitas que, conseqüentemente, se instalam nessas células, em especial nos macrófagos (UNANUE; ALLEN, 1978). Linfócitos T auxiliares são responsáveis por respostas contra parasitos de *Leishmania* controlando o perfil dos macrófagos infectados. Linfócitos Th1 que produzem IFN- $\gamma$  estão relacionados com a resolução da infecção, ao contrário de linfócitos Th2 que secretam IL-4 e outras citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  estão relacionados a susceptibilidade à infecção (HEINZEL et al., 1991; REINER; LOCKSLEY, 1995; SCOTT et al., 1989). Durante a infecção, pode ser observado o aumento da expressão de proteínas PD-L1, TIM-3 e CD1d (DA FONSECA-MARTINS, A. M et al 2021; AMPREY JL et al 2004; MISHRA, M et al., 2023). PD-L1 está associado com exaustão de respostas efetoras (DA FONSECA-MARTINS, AM et al., 2019), TIM-3 está associado com a supressão de respostas Th1 (MISHRA, M. et al 2023) e CD1d está associado com a apresentação de lipídios (AMPREY JL et al 2004). Diferentes modelos de leishmanioses apresentam diferentes respostas. Animais C57BL/6 são considerados resistentes à infecção por *L. major*, enquanto animais BALB/c são considerados susceptíveis. Isto se dá, principalmente, pelo perfil imunológico desenvolvido por estes modelos. Enquanto os animais C57BL/6 desenvolvem predominantemente resposta celular do tipo 1, animais BALB/c desenvolvem majoritariamente resposta do tipo 2. No modelo de leishmaniose experimental causado por *L. amazonensis*, por outro lado, esta dicotomia entre respostas Th1 e Th2 e o perfil de resistência e suscetibilidade à doença não é tão clara. Animais BALB/c continuam susceptíveis, no entanto, apresentam resposta humoral do tipo 1 significativa com a produção de IgG2a (FIRMINO-CRUZ et al., 2018). Os animais C57BL/6 são considerados parcialmente resistentes, com forte presença de respostas Th1 e Th2 simultaneamente, além de citocinas anti-inflamatórias (SOONG et al., 1997). Além disso, já foi observado que os transcritos de Th2 não estão associados com a

manutenção das doenças LCL e LCD na infecção por *Leishmania*, sugerindo que outras populações celulares podem estar associadas à infecção (Christensen SM et al., 2019). Além disso, já se sabe que o linfócito B também está presente na resposta contra a infecção com *Leishmania*, produzindo anticorpos e IL-10 (FIRMINO-CRUZ et al., 2018). Como o presente trabalho tem o objetivo de avaliar os papel das células B na infecção por *L. amazonensis*, daremos maior enfoque nelas.

## 2 - Linfócito B

O Linfócito B é uma célula do sistema imune que está associada com a resposta imune humoral, sendo responsável por produzir anticorpos no soro e mucosas e também estar associada com a produção da citocina reguladora IL-10 (O’GARRA et al., 1992). Os linfócitos B ativados por antígenos, diversificam seus genes de imunoglobulina por hipermutação somática para gerar anticorpos de alta afinidade nos centros germinativos (KLEIN, U et al., 2008). Os anticorpos são a principal ferramenta efetora dos linfócitos B e podem ser encontradas principalmente no soro, mas também na urina, fluido espinhal, leite, saliva, lágrimas, linfonodos e baço (MESTECKY, 1972). Existem cinco classes de anticorpos, sendo elas: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. A IgG é a classe de anticorpos encontrada em maior quantidade no soro, possui subclasses: IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3. A IgM está relacionada com a resposta primária a patógenos. A IgA é encontrada em secreções, como saliva, lágrimas e fluidos nasais. A IgD, uma Ig presente na membrana e no soro, está relacionada com a diferenciação dos linfócitos B induzida pelo antígeno. A IgE é encontrada em baixas concentrações no soro e está associada com alergias desencadeando a liberação de histaminas e enzimas (SAÚDE, B 2022). A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina reguladora que atua nas células dos macrófagos a fim de produzir efeitos reguladores nas células T. Dentro da população de linfócitos B, temos subpopulações, incluindo os linfócitos B-1, que podem ainda ser divididos em B-1a e B-1b, e também os linfócitos B-2. Os linfócitos B-1 são conhecidos por produzirem altas quantidades de anticorpos naturais, principalmente IgM e IgG3, que reconhecem autoantígenos e antígenos externos e estão associados com a resposta imune inata (BAUMGARTH, 2011), também são capazes de produzir IL-10 e desempenhar funções regulatórias (O’GARRA et al., 1992). Já os linfócitos B-2 são conhecidos como as células B foliculares, envolvidos em respostas T dependentes, produção de anticorpos específicos e estão associados com a memória imunológica (Mesquita Júnior, D et al 2010). Também existem os linfócitos B reguladores que são capazes de produzir IL-10 e IL-35, sendo associados à

patogênese em diversas infecções (FIRMINO-CRUZ et al., 2018; SCHAUT et al., 2016; SHEN et al., 2014).

## 2.1 - Linfócito B na leishmaniose

A maior parte dos estudos ao redor dos linfócitos B nos modelos de infecção pelo gênero *Leishmania* indicam um papel patogênico destas células (ARCANJO ET AL. 2015, 2017; BUXBAUM AND SCOTT 2005; CHU ET AL. 2010; COLMENARES ET AL. 2002; DEAK ET AL. 2010; GERALDO ET AL. 2016; PALANIVEL ET AL. 1996; SMELT ET AL. 2000; WANASEN, XIN, AND SOONG 2008). Entretanto, alguns estudos correlacionam a presença de linfócitos B com a morte dos parasitos do gênero *Leishmania* (GIBSON-CORLEY et al., 2010, 2014). Animais BALB/Xid, caracterizados por agamaglobulinemia ligada ao X, têm baixíssimo número de linfócitos B-1 e apresentam linfócitos B-2 imaturos. Estes animais apresentam lesão crescente, assim como animais BALB/c, mas têm o desenvolvimento da lesão retardada nos modelos de *L. major* (HOERAUF et al., 1994). Animais BALB/Xid durante o modelo de infecção por *L. amazonensis* apresentam menor desenvolvimento no tamanho da lesão e diferença na carga parasitária quando comparados a animais BALB/c, além do aumento da susceptibilidade após a transferência adotiva de linfócitos B-1 (GONZAGA et al., 2017). Os anticorpos podem ser associados à patogênese na infecção com *Leishmania*. Dados prévios do nosso grupo indicam que os linfócitos B apresentam papel patogênico durante a infecção através da produção de anticorpos e IL-10 (FIRMINO-CRUZ, et al., 2018 ). Outros grupos demonstraram que nos soros de pacientes com LC, níveis de IgG e suas subclasses, particularmente IgG1 e IgG3, são significativamente aumentados (OZBILGE, H et al., 2006), também foi observado na LV que os soros de pacientes na fase aguda mostram forte estimulação de IgG, seguido de IgE, IgM e IgA (ANAM, K et al., 1999). Já no modelo BALB/c, pode ser observada uma resposta IgG1 prevalente que aumenta com o curso da infecção com *L. infantum* (PÉREZ-CABEZAS BEGOÑA et al., 2019), relacionando essa subclasse à patogênese. Na literatura, já é descrito que o papel imunomodulador dos linfócitos B-2 está principalmente associado com a produção de anticorpos e IL-10. Células B-2 têm capacidade de produzir mais IL-10 do que os linfócitos TCD4 e TCD8 em camundongos selvagens (FIRMINO-CRUZ, et al., 2018). E também que os linfócitos B em camundongos BALB/c podem estar associados à infecção por *Leishmania spp* como um fator imunossupressor justamente por sua capacidade de produzir anticorpos e IL-10 (FIRMINO-CRUZ, et al., 2019 ). Sendo assim, foi demonstrado que camundongos IL-10 <sup>-/-</sup> foram mais suscetíveis à infecção. Os resultados desse estudo

sugerem que as células B-1 podem desempenhar um papel importante na suscetibilidade a *L. infantum* (GONZAGA, W et al., 2015).

### **3 - Hipótese**

Durante a infecção com *L. amazonensis*, em animais suscetíveis, BALB/c que apresentam respostas do tipo 2 durante a infecção, os linfócitos B podem estar associados à patogênese, porém em modelos parcialmente resistentes, animais C57BL/6 que apresentam uma resposta do tipo 1 durante a infecção, os linfócitos B podem estar sendo educados por alguma citocina do tipo 1 fisiologicamente para não serem patogênicos.

## **4 - Objetivos**

### **4.1 - Objetivo Principal**

Avaliar o perfil fenotípico de Linfócitos B na infecção por *L. amazonensis* entre animais suscetíveis e parcialmente resistentes.

### **4.2 - Objetivos específicos**

- Determinar as diferenças no perfil lesional, carga parasitária e entre as respostas de células B nos modelos suscetíveis BALB/c e parcialmente resistentes C57BL/6.
- Avaliar a produção de anticorpos em ambos os modelos.
- Avaliar as populações celulares que estão relacionadas a essa produção.
- Avaliar a infecção em animais IL-10<sup>-/-</sup> e µMT

## **5 - Metodologia**

### **5.1 - Animais**

Camundongos BALB/c e C57BL/6 fêmeas com idade entre 4 e 8 semanas foram obtidos no biotério central do Centro de Ciências da Saúde (CCS), na Universidade Federal do

Rio de Janeiro (UFRJ). Camundongos  $\mu$ MT (animal deficiente em linfócitos B maduros) e IL-10<sup>-/-</sup> (deficientes na produção de IL-10) foram obtidos no biotério do laboratório de ImunoBiotecnologia no Instituto de Microbiologia Paulo de Goés da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Todos os camundongos foram mantidos em Racks Ventiladas, em Mini-isolador basic e alimentados com ração pelitzada (Nuvilab) para camundongos e água filtrada. CEUA: A37/21-161-18.

## **5.2 - Infecção *in vivo***

As promastigotas foram cultivadas a 26°C em meio completo M199 (Difco), com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 0,05% de Hemina (Sigma). Os parasitos foram obtidos através de ensaio de diluição limitante (LDA) feito a partir da maceração da pata de animais BALB/c infectados. Esses parasitos são mantidos em cultura até a quinta passagem para realização de experimentos de infecção *in vivo* com a fase estacionária da cultura. Foi realizado ensaio de infecção por via intradérmica na parte interna da orelha, utilizando  $2 \times 10^6$  de parasitas *de L. amazonensis*. Para a pata a infecção foi realizada com a mesma quantidade de parasitas porém no coxim plantar da pata traseira direita.

## **5.3 - Acompanhamento da lesão**

O acompanhamento do crescimento da lesão foi feito através da medida semanal, com medidor de espessura (Mitutoyo), da orelha infectada (em mm), descontando a medida da orelha antes da infecção. Para a pata, utilizamos um paquímetro (Mitutoyo).

## **5.4 - Determinação da carga parasitária**

Após eutanásia, o sítio da lesão (orelha ou pata) de cada animal foi retirado, colocado em banho de álcool 70% por um minuto e individualmente pesados. Os baços foram retirados e colocados em eppendorfs individuais com 1 mL de meio M199 (Difco) com adição de 10% de SFB (Cultilab) e 0,05% de Hemina (Sigma), e foram individualmente pesados. Os linfonodos foram retirados e colocados em eppendorfs com meio RPMI puro (Sigma-Aldrich). Após 1 minuto, as orelhas ou patas são retiradas do álcool e colocadas em papel alumínio e os linfonodos em eppendorfs com meio RPMI. Posteriormente, os sítios de lesão e todos os órgãos foram macerados manualmente. O número de parasitos no sítio da lesão e nos órgãos infectados dos animais foi determinado pela técnica de diluição limitante (LDA). Basicamente, são adicionados 150  $\mu$ L / poço de M199 contendo 10 % SFB (Cultilab) e 0.05% de Hemina em

placas de 96 poços de fundo chato. 50 µL do macerado foi adicionado ao primeiro poço da placa de 96 poços e fizemos uma diluição seriada 1:4 onde passamos 50 µL para cada poço pré-preenchido com 150 µL a cada diluição. Após isso, as placas foram incubadas à 26 °C. As culturas foram observadas ao microscópio óptico após 7 dias e 14 dias e foi realizado cálculo para quantificar o número de parasitos. Cálculo utilizado: Número de parasitas =  $4^x$  / (massa dos órgãos em gramas); onde x é o número do último poço em que os parasitas foram observados.

### **5.5 - ELISA para detecção de anticorpos**

Para detectarmos anticorpos específicos contra antígenos de *L. amazonensis*, utilizamos o ensaio de ELISA. Resumidamente: 5 µg de um lisado total de *L. amazonensis* foram plaqueados em placas de ELISA overnight; no dia seguinte, o líquido foi descartado e a placa foi incubada com a solução de bloqueio (PBS + 5 % Leite (Molico)) por 1h; as amostras de soro foram diluídas na solução de bloqueio, e após o término do tempo de bloqueio, o conteúdo é descartado e as amostras diluídas são adicionadas por pelo menos 2h; após esse tempo, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS + 0,05 % Tween 20; os anticorpos de detecção previamente diluídos segundo os fabricantes (Southern Biotech ou Invivogen) foram adicionados por 1h; as placas foram lavadas 5 vezes com PBS + 0,05 % Tween 20; o TMB (Invivogen) foi adicionado por no máximo 15 minutos; a reação foi parada pela adição de HCl 1M à placa; as densidades ópticas foram lidas em um espectrofotômetro à 450nm. Diluições utilizadas: Diluição de 1:3 começando em 1:10, 1:40, 1:120 e 1:360 nas amostras de IgM, IgE e IgA, já nas amostras de IgG e suas subclasses, diluição de 1:3 começando em 1:120 até 1:9720.

### **5.6 - Citometria de fluxo**

Os órgãos foram retirados durante a eutanásia, depois macerados e tiveram suas células contadas utilizando uma câmara de Neubauer (a viabilidade celular foi determinada utilizando azul de Trypan). As células foram plaqueadas em quantidades  $1 \times 10^6$  por poço em placas de cultura de fundo “U” de 96 poços. As colorações dos marcadores intracelulares e extracelulares foram realizadas seguindo as instruções do fabricante. As células foram reestimuladas ex vivo por 4 h com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA; 20 ng/mL) mais ionomicina (1 µg/mL) na presença de um inibidor do complexo de Golgi (brefeldina A) para a análise de citocina intracelular. Os marcadores extracelulares foram corados, as células foram fixadas e

permeabilizadas para permitir a coloração intracelular. Células de linfonodos de camundongos infectados e controles foram fenotipadas de acordo com os critérios descritos por Cossarizza et al 2017. Utilizamos os seguintes anticorpos neste trabalho: anti-CD19-Pe/Cy7 (6D5, Biolegend), anti-B220-PercP/Cy5.5 (RA3-6B2, Biolegend), anti-CD1d-FITC (1B1, Biolegend), anti-CD38-APC/Cy7 (90, Biolegend), anti-GL7-Pacific Blue™ (GL7, Biolegend), anti-Tim-3-Brilliant Violet 711 (RMT3-23, Biolegend), anti-PD-L1-APC (MIH5, Biolegend), anti-IL-10-Pe (Jes5-16E3, Biolegend).

## 5.7 - Análise e estatística

A análise dos resultados foi feita no programa GraphPad Prism 8 e a significância estatística das diferenças entre os grupos de camundongos foi determinada pelo teste Two way ANOVA e Teste T nas análises de crescimento de lesão, citometria, LDA e ELISA.

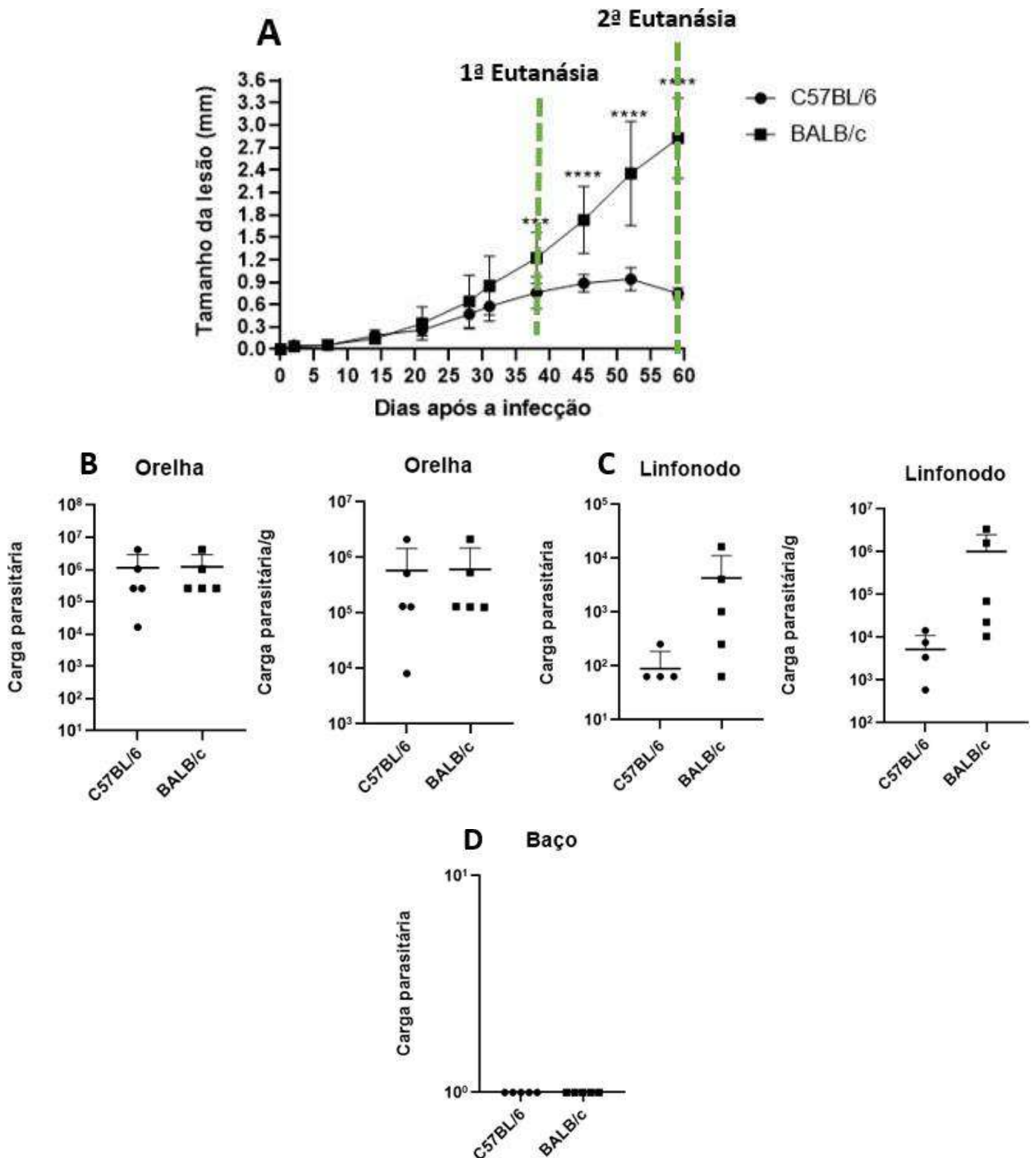
## 6 - Resultados

### 6.1 – Animais BALB/c apresentam maior lesão que animais C57BL/6 38 dias após a infecção, porém os grupos não apresentam diferença na carga parasitária.

Com o objetivo determinar as diferenças entre os modelos susceptíveis (BALB/c) e parcialmente resistentes (C57BL/6) durante a infecção, camundongos foram infectados na orelha esquerda com  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. amazonensis*. As lesões foram acompanhadas ao longo de 59 dias e foram feitas eutanásias de 2 grupos experimentais dentro desse período, uma aos 38dpi onde as lesões estariam começando a se diferenciar e uma aos 59 dpi, onde as lesões estariam totalmente diferentes, com o objetivo de entender as diferenças no perfil dos linfócitos B nesses modelos em momentos diferentes da infecção. Na primeira eutanásia, 38 dias após a infecção, momento em que as lesões estariam começando a se diferenciar, observamos que os animais BALB/c apresentavam uma lesão com média de 1.2mm e desvio padrão de aproximadamente 1.5mm e os animais C57BL/6 atingiram o pico apresentando uma lesão com média de 0.7 mm e desvio padrão de aproximadamente 0.8mm. (Figura 2A). A quantificação da carga parasitária na orelha (Figura 2B) e no linfonodo drenante (Figura 2C)



não apresentou diferença entre os grupos. Não foi encontrada carga parasitária no baço ( Figura 2D).



**Figura 2 - Acompanhamento da progressão da lesão e quantificação da carga parasitária após 38 dias de infecção por *L. amazonensis* em animais BALB/c e C57BL/6.** Animais BALB/c e C57BL/6 foram infectados na orelha esquerda por via intradérmica com  $2 \times 10^6$  de promastigotas de parasitos de *L. amazonensis*. Os animais foram acompanhados ao longo de 38

dias e as lesões foram medidas por paquimetria. Em seguida, os animais foram eutanasiados para a análise da quantificação da carga parasitária através da técnica de LDA. Progressão da Lesão (A); Quantificação da carga parasitária na orelha (B), no linfonodo (C) e no baço (D). Estatística entre os grupos foi determinada por teste T não pareado. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .  $n = 5$ . Dados de 1 experimento.

## 6.2 – Animais BALB/c apresentam maior lesão e carga parasitária que animais C57BL/6 59 dias após a infecção.

Após 59 dias de infecção, outro grupo de animais BALB/c e C57BL/6 foi eutanasiado para avaliar a diferença na resposta entre os grupos mediante a infecção por *L. amazonensis*. Neste estágio, os animais C57BL/6 apresentavam fase crônica da lesão com média de 0.74 mm e desvio padrão de aproximadamente 0.75mm, enquanto BALB/c ainda apresentava lesão progressiva com média de 2.8 mm e desvio padrão de aproximadamente 3.2mm. Através da quantificação da carga parasitária, observamos que animais BALB/c apresentaram maior carga parasitária na orelha (Figura 3A) e no linfonodo (Figura 3B), porém nenhum dos grupos apresentou carga parasitária no baço (Figura 3C).

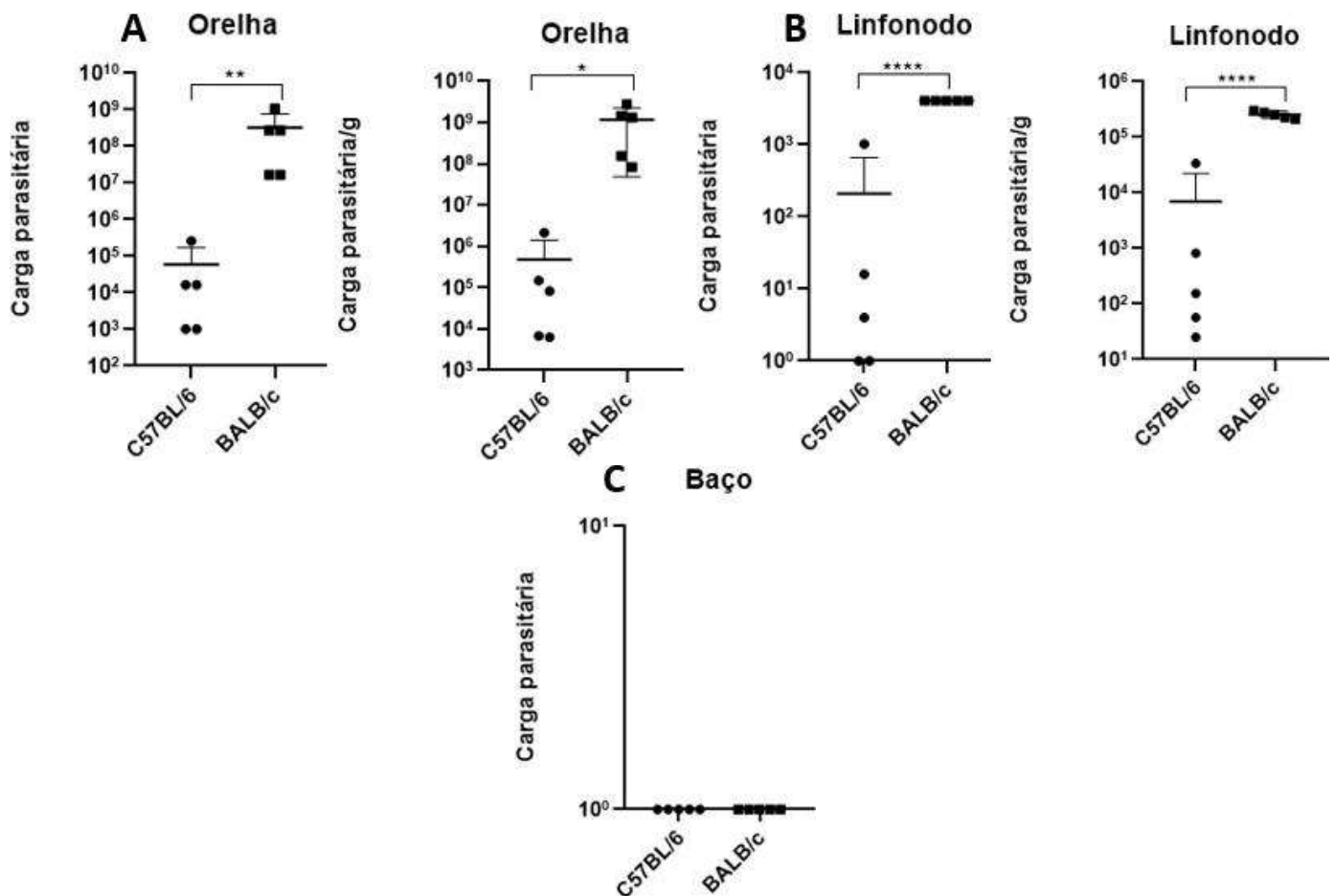


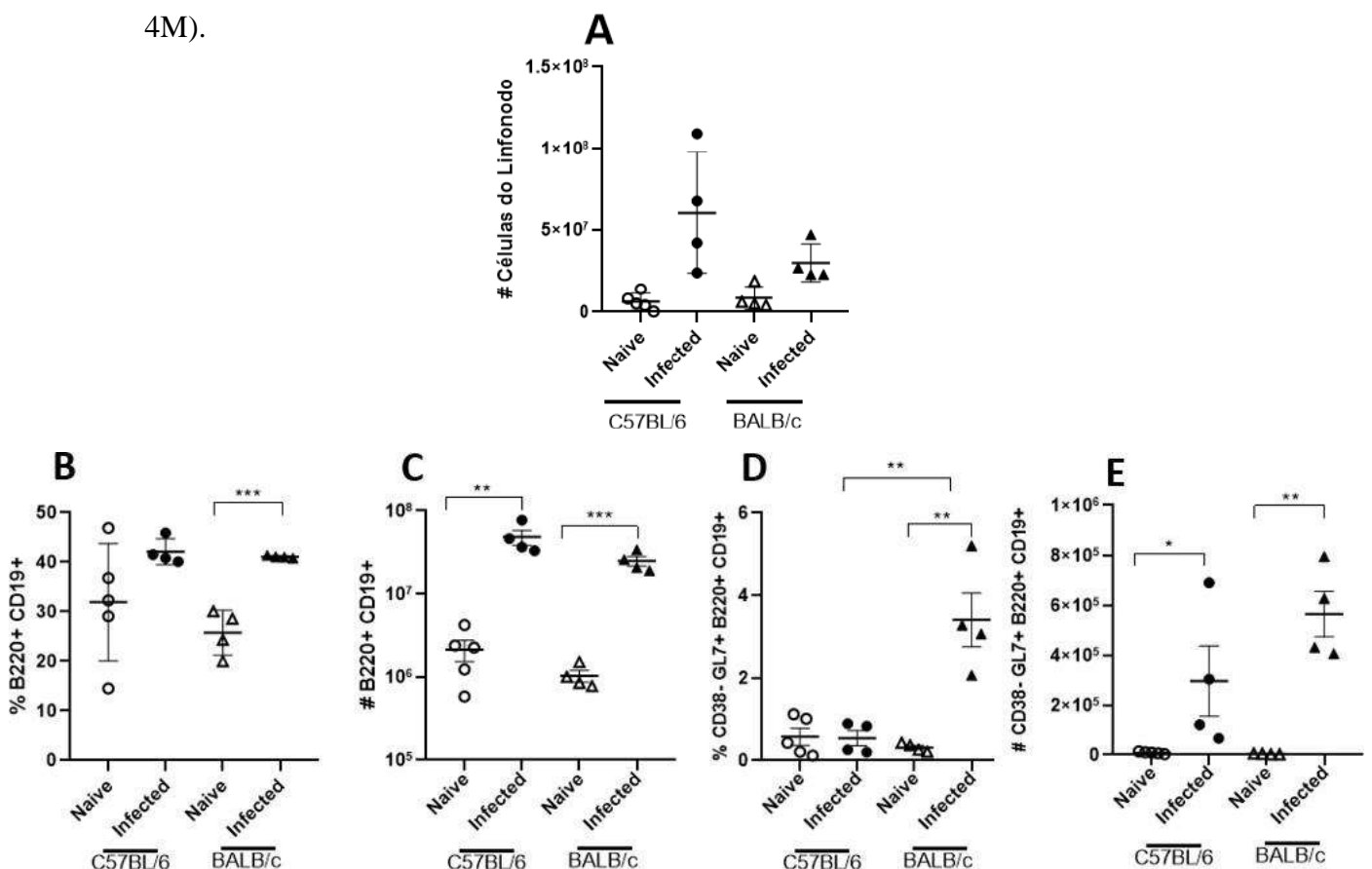
Figura 3 - Acompanhamento da progressão da lesão e quantificação da carga parasitária após 59 dias de infecção por *L. amazonensis* em animais BALB/c e C57BL/6. Animais

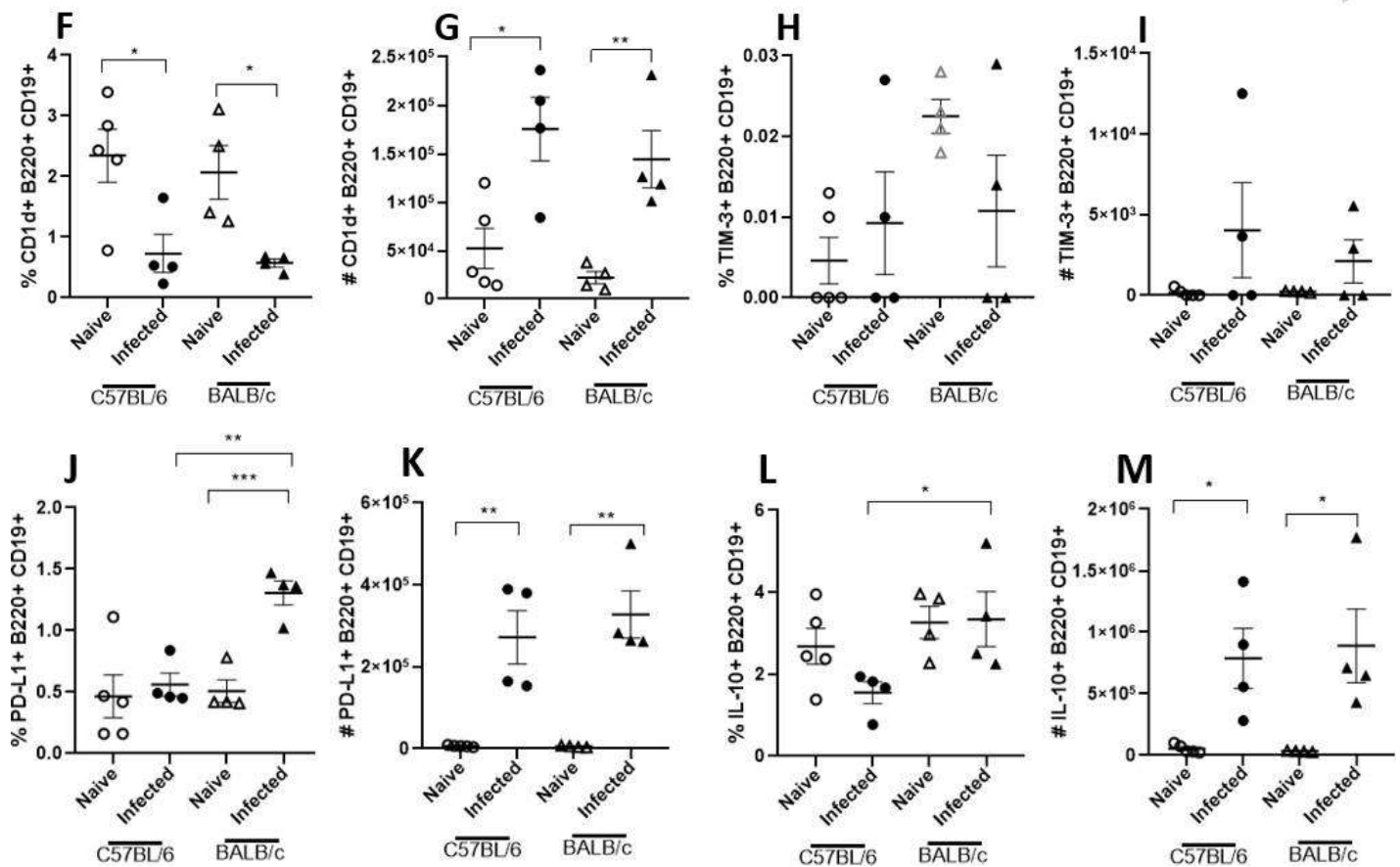
BALB/c e animais C57BL/6 foram infectados na orelha esquerda por via intradérmica com  $2 \times 10^6$  de promastigotas de *L. amazonensis*. Os animais foram acompanhados ao longo de 59 dias e as lesões foram medidas por paquimetria. Após isso, foram eutanasiados para a análise da quantificação da carga parasitária através da técnica de LDA. Quantificação da carga parasitária na orelha após 59 dias (A), no linfonodo (B) e no baço (C). Estatística entre os grupos foi determinada por teste T não pareado. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . n = 5. Dados de 1 experimento.

### **6.3 – Animais BALB/c apresentaram maior proporção de linfócitos B no centro germinativo e linfócitos B produtores de IL-10 no linfonodo após 38 dias de infecção do que animais C57BL/6.**

Após 38 dias de infecção, animais BALB/c e C57BL/6 foram eutanasiados e avaliamos a resposta de células B no linfonodo drenante cervical desses animais. Primeiramente, observamos que animais infectados tem expansão de células totais no linfonodo (Figura 4A). Em relação aos linfócitos B totais, nós não observamos diferença em relação a porcentagem entre camundongos C57BL/6 naive e infectado e nem entre animais BALB/c naive e infectado comparados ao C57BL/6, no entanto, observamos que os camundongos BALB/c infectados apresentam maior proporção de linfócitos B totais em relação aos BALB/c naives (Figura 4B). Em relação ao número, nós observamos que tanto os camundongos C57BL/6 infectados quanto os BALB/c infectados apresentaram maior número de linfócitos B totais em comparação aos animais naives, no entanto, não apresentando diferença entre as linhagens (Figura 4C). Avaliando as células B presentes no centro germinativo, nós observamos que não houve diferença entre os animais naive e infectado de C57BL/6, porém, observamos que animais BALB/c infectados apresentaram maior proporção de linfócitos B no centro germinativo que os naives, além de que observamos que os camundongos BALB/c infectados, apresentaram maior proporção que os animais C57BL/6 infectados (Figura 4D). Em relação ao número de células, animais C57BL/6 infectados tinham maior número do que os animais naives e observamos que animais BALB/c infectados apresentavam maior número de linfócitos B de centro germinativo que animais BALB/c naive, porém não observamos diferenças no número entre animais BALB/c e C57BL/6 (Figura 4E). Analisando linfócitos B que expressam CD1d, observamos que animais C57BL/6 infectados apresentaram menor proporção que animais naives, o mesmo se observa em animais BALB/c naives, onde apresentam maior proporção que animais infectados, entretanto, não observamos diferença entre os grupos C57BL/6 e BALB/c (Figura 4F). Em relação ao número, animais C57BL/6 infectados apresentaram maior número

de linfócitos B que expressam CD1d que animais naives. Não foi observada diferença entre animais C57BL/6 e BALB/c, porém, animais BALB/c infectados apresentaram maior número em relação aos naives (Figura 4G). Ao avaliarmos linfócitos B que expressam TIM-3, observamos que não houve diferenças na proporção entre animais BALB/c e C57BL/6 naives e infectados e não houve diferença também entre os grupos (Figura 4H), em relação ao número, não observamos diferenças entre animais BALB/c e C57BL/6 naives e infectados e também não observamos diferenças no número entre os grupos BALB/c e C57BL/6 (Figura 4I). Avaliando linfócitos B que expressam PD-L1, observamos que não houve diferença entre animais naives e infectados de C57BL/6, porém animais BALB/c infectados apresentaram maior proporção em relação aos animais BALB/c naives, e animais BALB/c infectados apresentaram maior proporção que animais C57BL/6 infectados (Figura 4J). Analisando o número, camundongos C57BL/6 infectados apresentaram maior número em comparação aos naives, assim como animais BALB/c infectados apresentaram maior número em relação aos naives, porém não observamos diferença no número entre animais C57BL/6 e BALB/c (Figura 4K). Avaliando linfócitos B produtores de IL-10, não observamos diferença na proporção desses linfócitos entre animais naives e infectados de C57BL/6, porém, animais C57BL/6 infectados apresentaram menor proporção que animais BALB/c infectados. Não foi observada diferença entre animais BALB/c naives e infectados (Figura 4L). Avaliando o número, observamos que animais C57BL/6 infectados apresentavam maior número que animais naives e animais BALB/c infectados apresentavam maior número que animais BALB/c naives (Figura 4M).



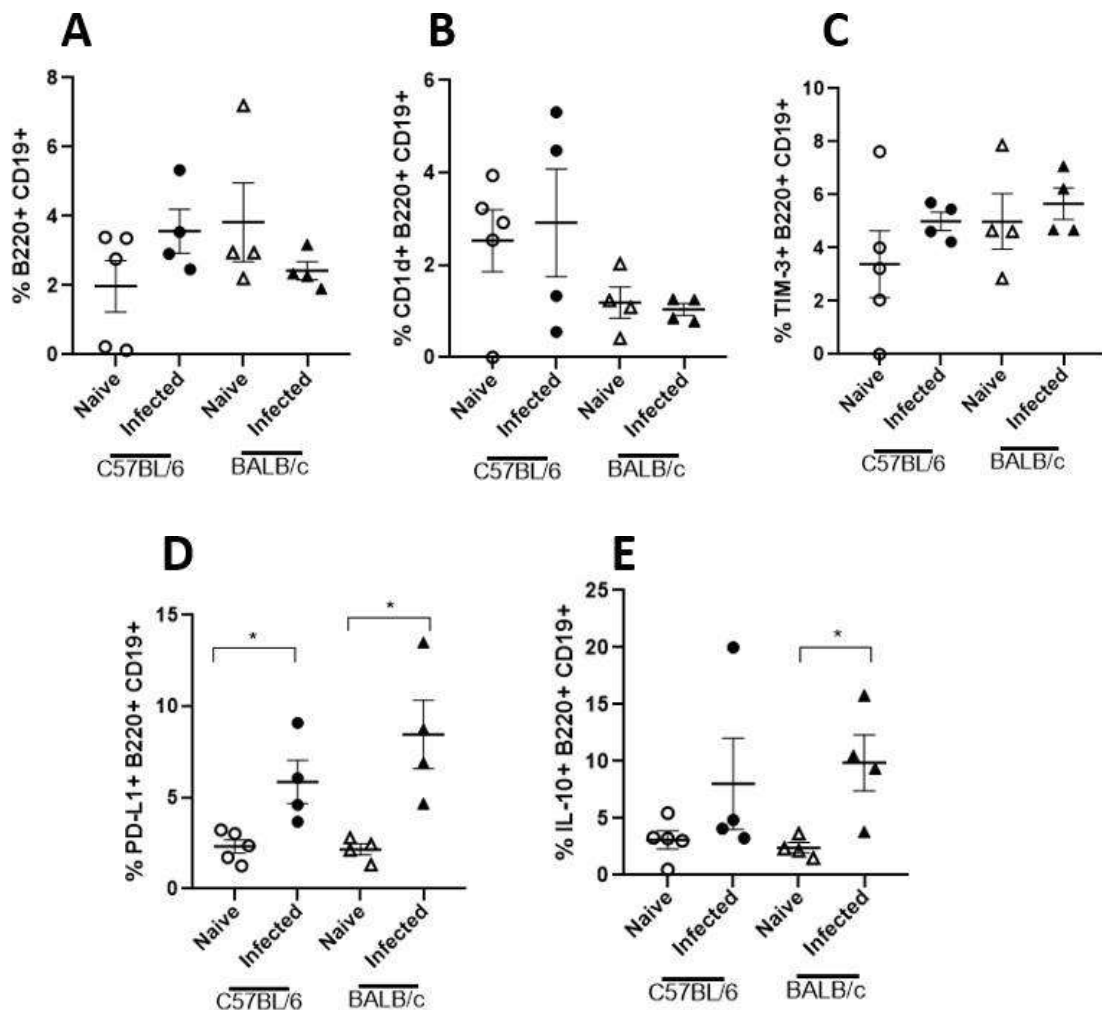


**Figura 4 – Animais BALB/c apresentam maior proporção de linfócitos B no centro germinativo e linfócitos B produtores de IL-10 no linfonodo que animais C57BL/6.** Animais BALB/c e C57BL/6 foram infectados com  $2 \times 10^6$  de promastigotas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. Após 38 dias, os animais foram eutanasiados e as células do linfonodo drenante foram processadas e marcadas para citometria de fluxo. Número de células no linfonodo (A). Porcentagem e número de Linfócitos B totais do linfonodo (B e C), Linfócitos B de centro germinativo (D e E), Linfócitos B que expressam CD1d+ (F e G), TIM-3 (H e I), PDL-1 (L e K) e produzem IL-10 (L e M). Estatística entre os grupos foi determinada por teste T não pareado. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $n = 5$ ; 4 Dados preliminares de 1 experimento.

#### 6.4 - Animais BALB/c e C57BL/6 não apresentaram diferenças na proporção e no número de linfócitos B totais, que expressam CD1d, PDL-1, TIM-3 e produzem IL-10 na orelha após 38 dias de infecção.

Após 38 dias de infecção, animais BALB/c e C57BL/6 foram eutanasiados e avaliamos as respostas de linfócitos B na orelha desses animais. Ao avaliarmos os linfócitos B totais na orelha, observamos que não houve diferença na proporção de linfócitos B entre animais naives e infectados de C57BL/6 e naives e infectados de BALB/c, a diferença também não foi observada entre os grupos (Figura 5A). Avaliando linfócitos B que expressam CD1d,

observamos que não houve diferença na proporção de linfócitos B entre animais naives e infectados de C57BL/6 e naives e infectados de BALB/c, a diferença também não foi observada entre os grupos (Figura 5B), em relação a linfócitos B que expressam TIM-3, observamos que não houve diferença na proporção de linfócitos B entre animais naives e infectados de C57BL/6 e naives e infectados de BALB/c, a diferença também não foi observada entre os grupos (Figura 5C). Avaliando linfócitos B que expressam PD-L1, vimos que animais C57BL/6 apresentou maior proporção em relação ao naive, assim como os animais BALB/c infectados em relação aos BALB/c naives, porém, não vimos diferença entre os grupos (Figura 5D). Em relação aos linfócitos B produtores de IL-10, observamos que não houve diferença na proporção entre animais C57BL/6 naive e infectados e nem em comparação a animais BALB/c, porém observamos que animais BALB/c infectados apresentaram maior proporção que animais naive (Figura 5E).



**Figura 5 – Animais BALB/c e C57BL/6 não apresentaram diferença em níveis e número de linfócitos B totais na orelha, linfócitos B produtores de IL-10, PDL-1, CD1d e TIM-3.**

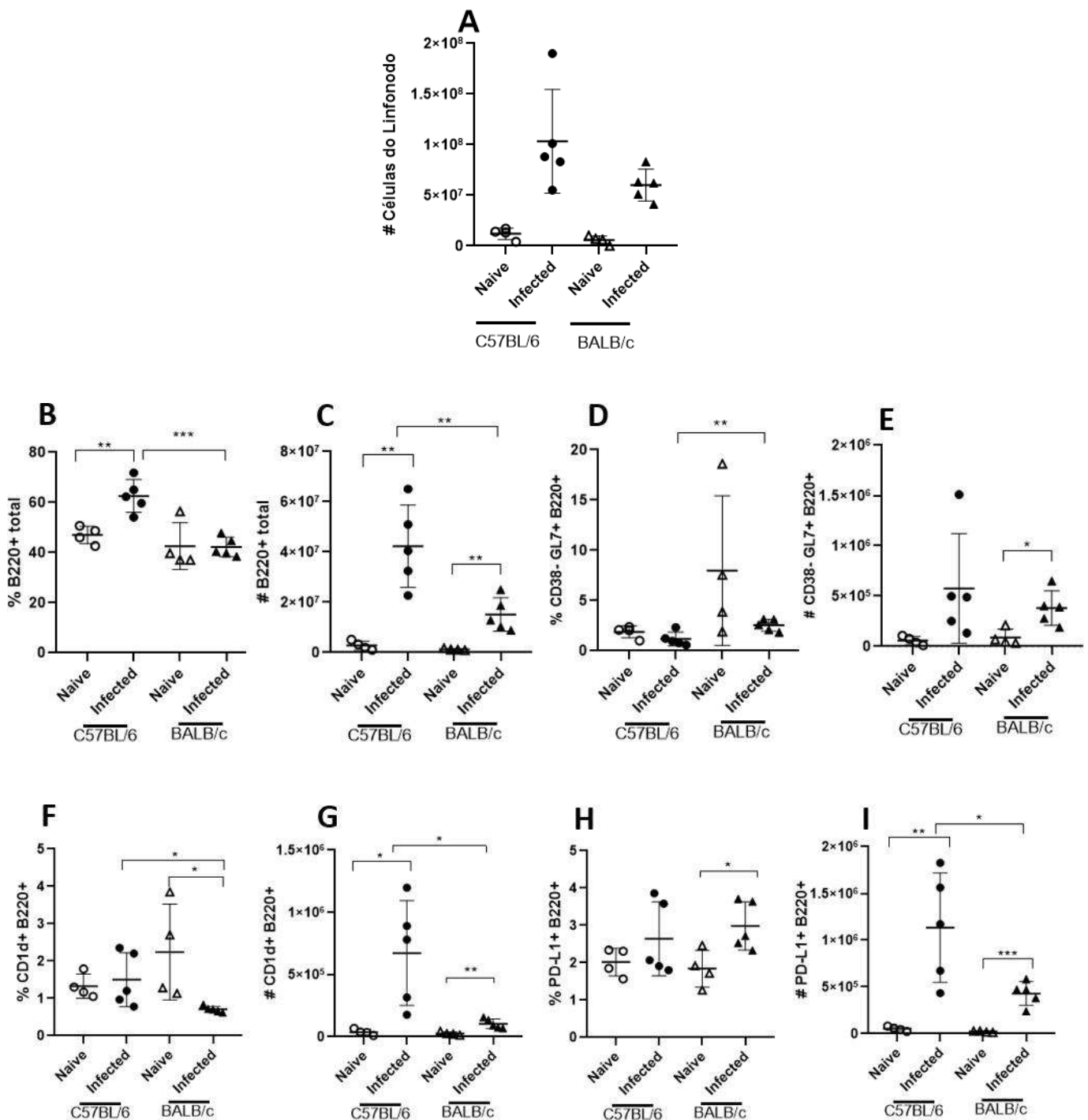
Animais BALB/c e C57BL/6 foram infectados com  $2 \times 10^6$  de promastigotas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. Após 38 dias, os animais foram eutanasiados e as células da orelha foram

processadas e marcadas para citometria de fluxo. Porcentagem de linfócitos B totais da orelha (A), linfócitos B que expressam CD1d (B), TIM-3 (C), PD-L1 (D) e produzem IL-10 (E). Estatística entre os grupos foi determinada por teste T não pareado. \* $p < 0,05$ .  $n = 5;4$ . Dados de 1 experimento.

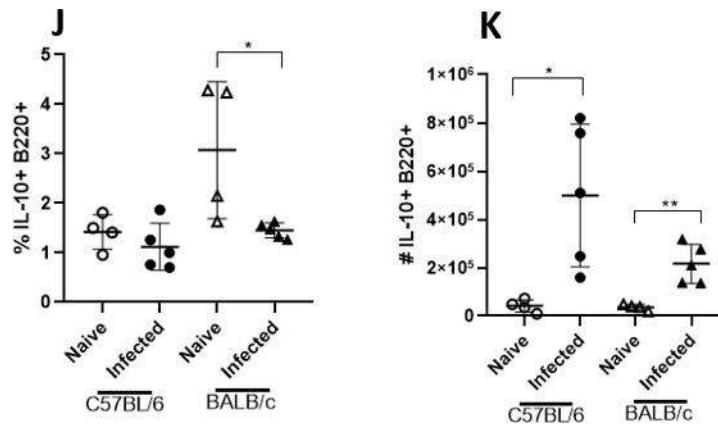
### **6.5 - Animais C57BL/6 apresentam maior proporção e número de células B totais e B que expressam CD1d, porém menor proporção de células B de centro germinativo nos linfonodos drenantes após 59 dias.**

Após 59 dias de infecção, onde as lesões estão diferentes e o modelo BALB/c apresenta lesões maiores, animais BALB/c e C57BL/6 foram eutanasiados e avaliamos as respostas de linfócitos B no linfonodo desses animais. Observamos que animais infectados tem expansão de células no linfonodo (Figura 6A). Em relação aos linfócitos B totais do C57BL/6 infectados apresentaram maior proporção em comparação aos naives, além disso, animais C57BL/6 infectados apresentaram maior proporção em comparação a animais BALB/c infectados também, porém não observamos diferenças entre animais naives e infectados de BALB/c (Figura 6B), já em relação ao número, observamos que animais infectados de C57BL/6 e BALB/c apresentavam maior número que os naives, além de que animais C57BL/6 infectados apresentavam maior número que animais BALB/c infectados (Figura 6C). Em relação a linfócitos B de centro germinativo, não observamos diferença na proporção entre animais naives e infectados de ambos os grupos, porém, animais BALB/c infectados apresentaram maior proporção que animais C57BL/6 infectados (Figura 6D), já em relação ao número, não foram observadas diferenças entre animais naives e infectados de ambos os grupo e nem diferença entre os grupos (Figura 6E). Ao analisar linfócitos B que expressam CD1d, observamos que não houve diferença na proporção entre animais C57BL/6 infectados com os naives, porém, animais C57BL/6 infectados apresentaram maior proporção que animais BALB/c infectados, além disso, animais BALB/c infectados apresentaram menor proporção que animais naives (Figura 6F). Em relação ao número de células, observamos que animais C57BL/6 infectados apresentaram maior número quando comparado a animais C57BL/6 naives e também maior número que animais BALB/c infectados. No entanto, animais BALB/c infectados apresentaram maior número que animais BALB/c naives (Figura 6G). Em relação aos linfócitos B que expressam PDL-1, observamos que não houve diferença na proporção entre animais C57BL/6 naives e infectados, e nem diferenças em comparação com animais BALB/c naives e infectados, porém, animais BALB/c infectados apresentaram maior proporção que

animais naives (Figura 6H), já em relação ao número, observamos que animais C57BL/6 infectados apresentaram maior número que animais C57BL/6 naives e também maior número que animais BALB/c infectados, porém, animais BALB/c infectados apresentaram maior número que animais BALB/c naives (Figura 6I). Em relação aos linfócitos B produtores de IL-10, observamos que não houve diferença na proporção entre animais C57BL/6 naives e infectados, e nem diferenças em comparação com animais BALB/c naives e infectados, porém, animais BALB/c infectados apresentaram maior proporção que animais naives (Figura 6J), já analisando o número, observamos que animais C57BL/6 e BALB/c infectados apresentaram maior número que animais naives, e não observamos diferença entre os grupos (Figura 6K).







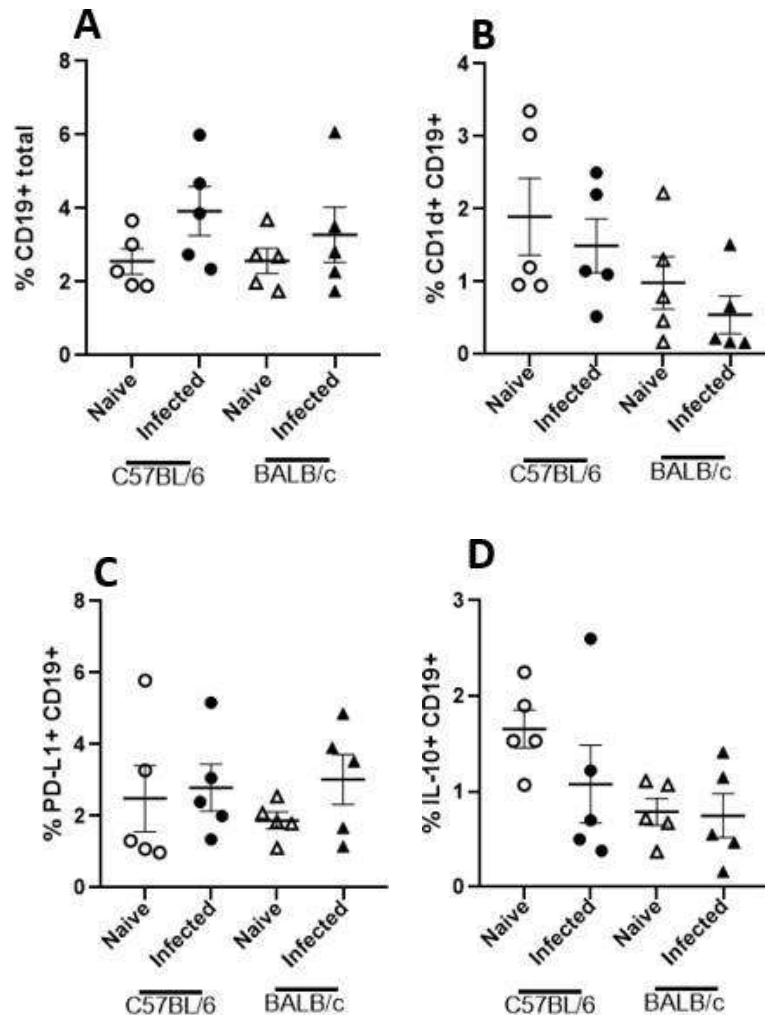
**Figura 6 - C57BL/6 apresentaram diferença em proporção e número de linfócitos B totais e linfócitos B produtores CD1d+ no linfonodo drenante em comparação a animais BALB/c, porém menor nível de linfócitos B de centro germinativo.**

Animais BALB/c e C57BL/6 foram infectados com  $2 \times 10^6$  de promastigotas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. Após 59 dias, os animais foram eutanasiados e as células do linfonodo drenante foram processadas e marcadas para citometria de fluxo. Número de células no linfonodo (A). Porcentagem e número de Linfócitos B totais do linfonodo (B e C), Linfócitos B de centro germinativo (D e E), Linfócitos B que expressam CD1d+ (F e G), PdL-1 (H e I) e produzem IL-10 (J e K). Estatística entre os grupos foi determinada por teste T não pareado. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $n = 5;4$ . Dados preliminares de 1 experimento.

### **6.6 - Animais BALB/c e C57BL/6 não apresentaram diferenças na proporção de linfócitos B totais, que expressam CD1d, PDL-1 e produzem IL-10 na orelha após 59 dias.**

Após 59 dias de infecção, animais BALB/c e C57BL/6 foram eutanasiados e avaliamos as respostas de linfócitos B na orelha desses animais. Ao avaliarmos os linfócitos B totais na orelha, observamos que não houve diferença na proporção entre animais naives e infectados de C57BL/6 e naives e infectados de BALB/c, a diferença também não foi observada entre os grupos (Figura 7A). Avaliando linfócitos B que expressam CD1d, observamos que não houve diferença na proporção entre animais naives e infectados de C57BL/6 e naives e infectados de BALB/c, a diferença também não foi observada entre os grupos (Figura 7B). Avaliando linfócitos B que expressam PDL-1, observamos que não houve diferença na proporção entre animais naives e infectados de C57BL/6 e naives e infectados de BALB/c, a diferença também não foi observada entre os grupos (Figura 7C). Em relação aos linfócitos B produtores de IL-10, observamos que não houve diferença na proporção entre animais C57BL/6 naive e

infectados e naives e infectados de BALB/c, a diferença também não foi observada entre as linhagens (Figura 7D), mas a nosso estímulo não funcionou bem. Entendemos isso pois experimentos anteriores do nosso grupo mostraram que o modelo BALB/c produz mais IL-10 que animais C57BL/6, portanto, repetiremos essa análise para melhores conclusões.



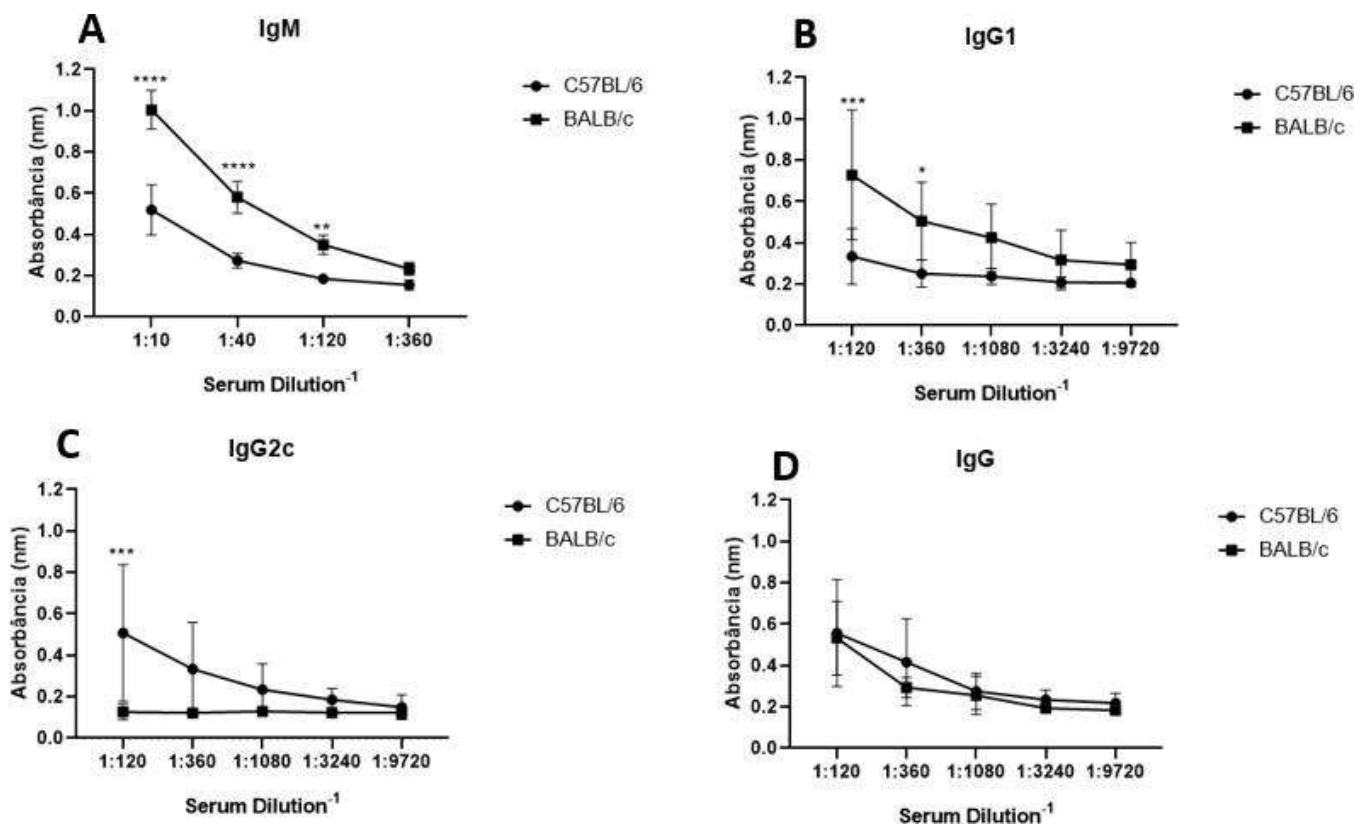
**Figura 7 – Animais BALB/c e C57BL/6 não apresentaram diferenças na proporção de linfócitos B totais na orelha, linfócitos B produtores de IL-10 e que expressam PDL-1 e CD1d.**

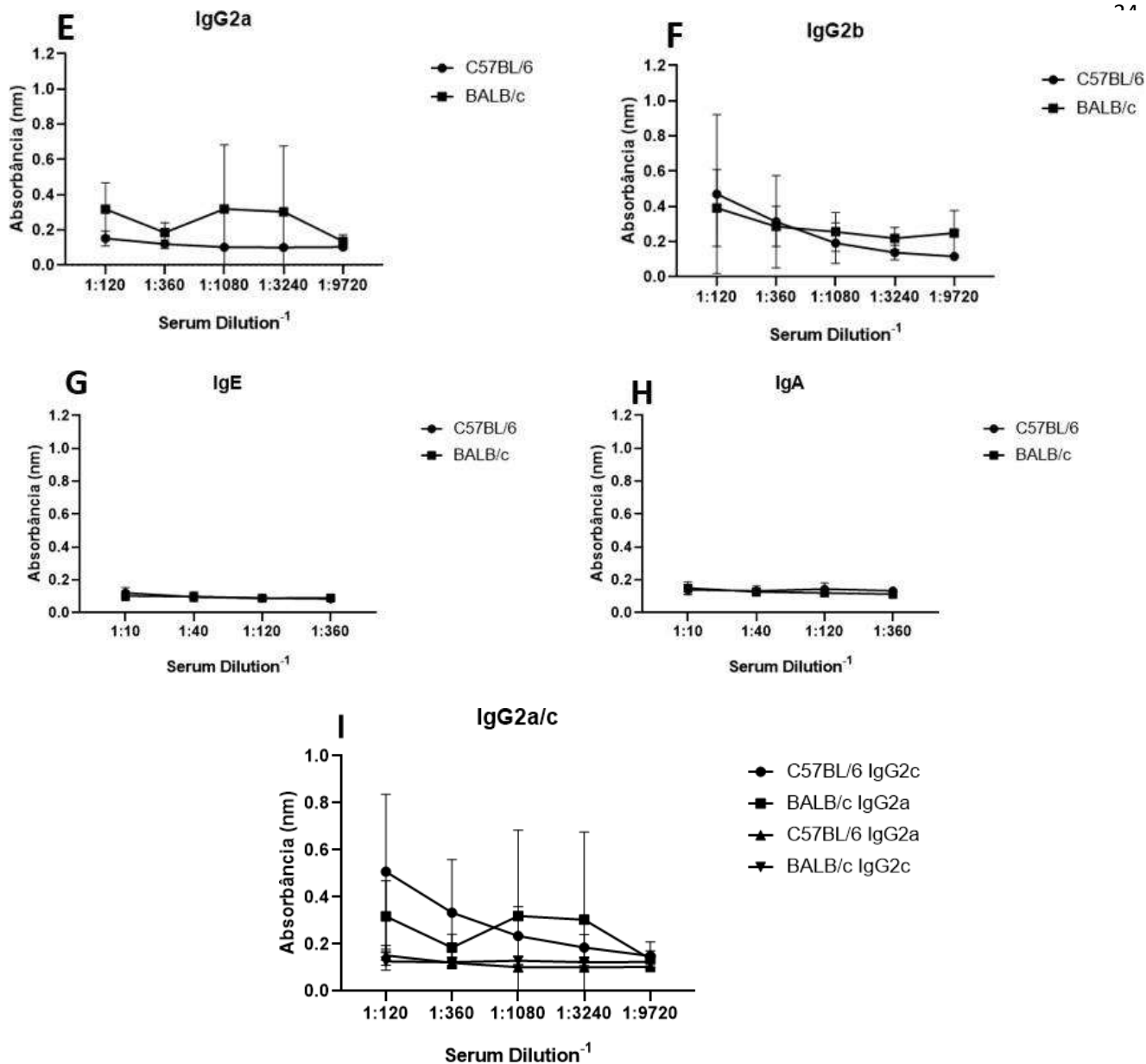
Animais BALB/c e C57BL/6 foram infectados com  $2 \times 10^6$  de promastigotas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. Após 59 dias, os animais foram eutanasiados e as células da orelha foram processadas e marcadas para citometria de fluxo. Porcentagem de linfócitos B totais do linfonodo (A), linfócitos B que expressam CD1d (B), PD-L1 (C) e produzem IL-10 (D).

Estatística entre os grupos foi determinada por teste T não pareado. n = 5. Dados de 1 experimento.

### 6.7 - Animais BALB/c apresentaram níveis maiores de IgM e IgG1 que animais C57BL/6, porém níveis menores de IgG2c.

Durante a infecção por *L. amazonensis*, o papel dos anticorpos é incerto nos diferentes modelos, por isso verificamos a produção de IgM, IgG, as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e também IgE e IgA em camundongos BALB/c e C57BL/6. Após 38 dias de infecção, observamos que animais BALB/c produziam maiores níveis de IgM (Figura 8A) e IgG1 (Figura 8B) específicos para *L. amazonensis* que animais C57BL/6, porém apresentavam níveis menores de IgG2c (Figura 8C). Não foram observadas diferenças em relação a IgG (Figura 8D), IgG2a (Figura 8E), IgG2b (Figura 8F), IgE (Figura 8G) e IgA (Figura 8H) após 38 dias e observamos que ambos os grupos não produziram IgE e IgA. Também comparamos a produção de IgG2a/c pois sabemos que animais BALB/c não produzem IgG2c assim como animais C57BL/6 não produzem IgG2a, porém não vimos diferenças (Figura 8I).



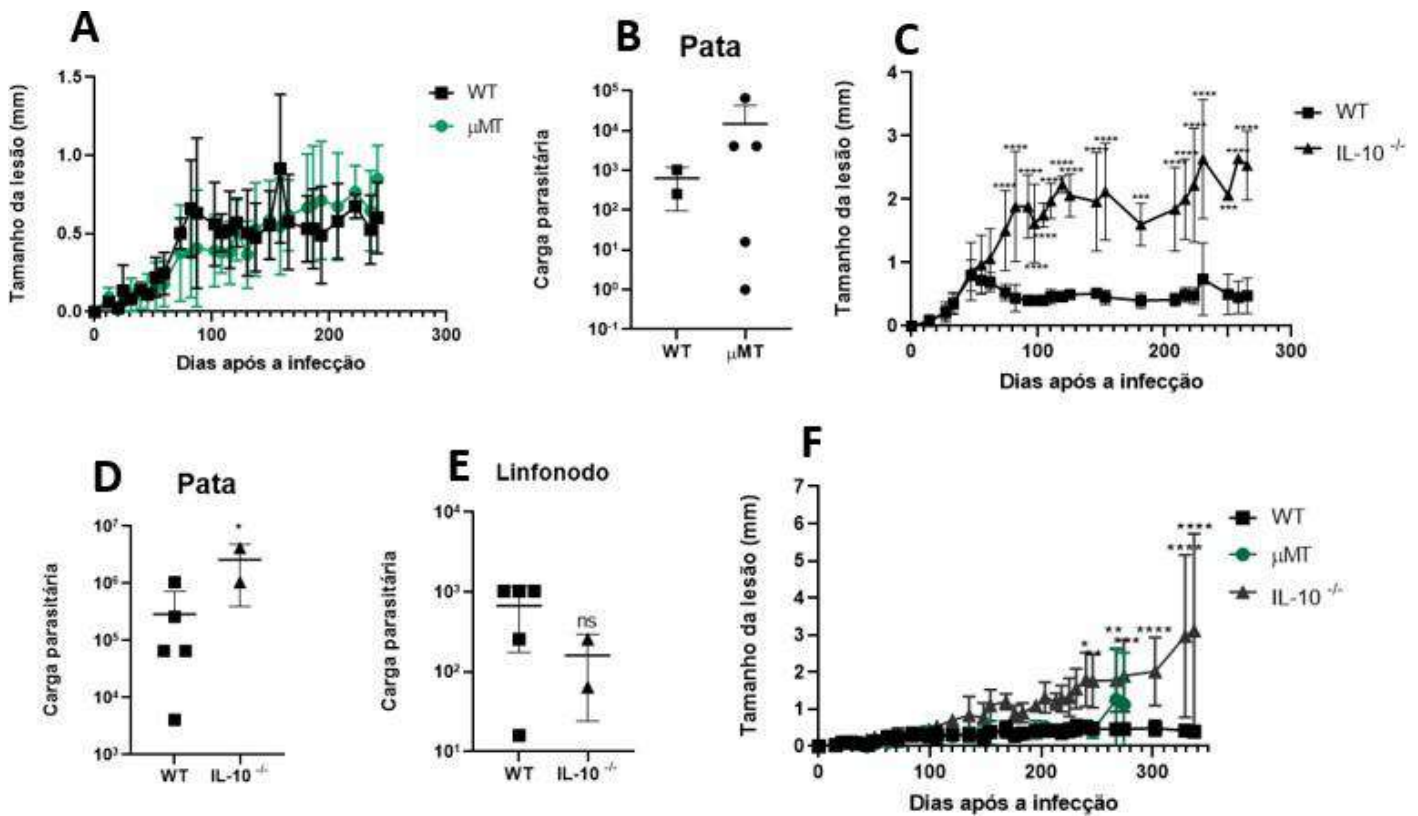


**Figura 8 - Animais BALB/c apresentaram níveis maiores de IgM e IgG1 que animais C57BL/6, porém níveis menores de IgG2c.**

Animais BALB/c e C57BL/6 foram infectados com  $2 \times 10^6$  parasitos *Leishmania amazonensis* na orelha esquerda e o sangue de animais de ambos os grupos foi coletado 38 dias após a infecção. Anticorpos específicos anti-antígenos totais de *L. amazonensis* foram determinados por ELISA. As curvas (A, B, C, D, E, F, G, H e I) foram determinadas pela densidade óptica de cada diluição. Estatísticas para gráficos de curva de diluição foram feitas por Two-way ANOVA.

**6.8 – O linfócito B não parece ser importante na infecção de animais C57BL/6, mas a IL-10 parece ser importante para controlar lesão e carga.**

Para determinar se o linfócito B e a citocina reguladora IL-10 são patogênicos em animais C57BL/6, infectamos animais  $\mu$ MT, que são animais deficientes em células B, e animais IL-10<sup>-/-</sup>, que são animais que não produzem IL-10, com  $2 \times 10^6$  de parasitos de *L. amazonensis* na pata direita e acompanhamos a progressão da lesão. Nossos dados sugerem que o linfócito B no animal C57BL/6 parece não ser importante para a progressão da lesão e carga parasitária, diferente do que é observado no animal BALB/c. Não observamos diferenças na progressão da lesão (Figura 9A) e não observamos diferenças também na carga parasitária da pata 241dpi (Figura 9B). Além disso, a IL-10 parece ser importante para o controle da lesão (Figura 9C), controle da carga parasitária no sítio da lesão (Figura 9D), mas não no linfonodo (Figura 9E) 265dpi.



**Figura 9 - Acompanhamento da progressão da lesão e quantificação da carga parasitária após 101 dias de infecção por *L. amazonensis* em animais  $\mu$ MT.**

Animais deficientes em células B ( $\mu$ MT<sup>-/-</sup>) e que não produzem IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>), foram infectados na pata direita com  $2 \times 10^6$  de promastigotas de parasitos de *L. amazonensis*. Os animais foram acompanhados e as lesões foram medidas por paquimetria. Após isso, foram

eutanasiados para a análise da quantificação da carga parasitária através da técnica de LDA. Progressão da Lesão de animais  $\mu$ MT (A); Quantificação da carga parasitária na pata de animais  $\mu$ MT (B), Progressão da lesão em animais IL-10  $-/-$  (C) Quantificação da carga parasitária na pata (D), no linfonodo (E) e progressão da lesão de animais  $\mu$ MT, IL-10 e WT (F). Estatísticas para lesão foi feita por Two-way ANOVA e para carga parasitária foi feita por T teste não pareado. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . \* indicam diferenças entre os grupos WT e IL-10 $-/-$  indicam diferenças entre os grupos IL-10 $-/-$  e  $\mu$ MT. n= 2-5. n = 2-5. Dados representando experimentos independentes.

### Tabela resumindo os resultados encontrados:

A		B		C		
	38dpi	38dpi	59dpi	59dpi		
Bcell CG	↑	↓	↑	↓	IgM	↑ ↓
PD-L1	↑	↓	=	=	IgG	= =
CD1d	=	=	↓	↑	IgG1	↑ ↓
TIM-3	=	=	*	*	IgG2a/c	= =*
IL-10	↑	↓	=*	=	IgG2b	= =
					IgG2c	↓ ↑
					IgE	- -
					IgA	- -

**Tabela 1 – Resumo dos resultados de citometria de fluxo no linfonodo drenante (A), no sítio da lesão (B) e quantificação de anticorpos (C). (\*) – Significa que tivemos algum problema com o marcador ou amostra.**

## 7 – Discussão

O papel dos linfócitos B durante a infecção pelo gênero *Leishmania* vem sendo estudado há algum tempo. A presença de linfócitos B é normalmente qualificada ou pela produção de anticorpos ou de IL-10 em infecções por *L. donovani* (SMELT et al., 2000), *L. amazonensis*

(FIRMINO-CRUZ et al., 2018, 2019; 209 GONZAGA et al., 2017; WANASEN; XIN; SOONG, 2008), *L. mexicana* (BUXBAUM; SCOTT, 2005; CHU et al., 2010), *L. major* (ARCANJO et al., 2017a; BABAI et al., 1999), *L. pifanoi* (COLMENARES et al., 2002) e *L. infantum* (ARCANJO et al., 2017b; DEAK et al., 2010; GONZAGA et al., 2015). Apesar da IL-10 ser associada à patogênese, a produção desta citocina dificilmente era associada ao linfócito B *in vivo*. A presença de anticorpos no modelo susceptível, BALB/c, é associada com um perfil patogênico durante a infecção (BUXBAUM; SCOTT, 2005; CHU et al., 2010; COLMENARES et al., 2002; DEAK et al., 2010; FIRMINO-CRUZ et al., 2018), porém, no C57BL/6, que é considerado o modelo parcialmente resistente, a presença de anticorpos foi descrita como importante na eliminação de *L. amazonensis* por macrófagos *in vitro* (GIBSON-CORLEY et al., 2010, 2014). Levando isso em consideração, podemos dizer que o papel dos linfócitos B é controverso nos modelos de infecção por espécies do gênero *Leishmania* e que ainda são necessários estudos sobre esse tema para entender o papel desses linfócitos. Para entender a participação dos linfócitos B nos modelos susceptíveis e parcialmente resistentes, fizemos uma infecção pareada entre animais C57BL/6 e BALB/c, com o objetivo de entender as diferenças na infecção entre os modelos, bem como avaliar a produção de anticorpos e identificar as populações que estão associadas a essa produção. Infectamos ambos os grupos na orelha e ao longo de 59 dias fizemos a eutanásia de 2 grupos experimentais, uma aos 38 dpi, ponto onde as lesões estavam começando a apresentar diferença estatística e outra aos 59 dpi, ponto onde os grupos apresentavam lesões em tamanhos diferentes, onde o animal BALB/c apresentaria maiores lesões que animais C57BL/6. Com as lesões começando a se diferenciar, não observamos diferenças na carga parasitária no sítio da lesão e no linfonodo drenante entre os grupos, e não foi observada carga parasitária no baço. Já com 59 dias de infecção, quando as lesões estavam diferentes e animais BALB/c apresentavam lesões maiores que animais C57BL/6, observamos diferenças na carga parasitária no sítio da lesão e no linfonodo, onde animais BALB/c apresentavam carga elevada em comparação aos animais C57BL/6, isso se dá pelo fato de que os animais C57BL/6 estão em um ponto crônico da infecção, onde eles conseguem controlá-la parcialmente, porém, não foi observada carga parasitária no baço em ambos os grupos, mostrando que em ambos os pontos não houve visceralização em ambos os modelos. Além disso, analisamos algumas populações de linfócitos B no linfonodo drenante. Primeiramente, após 38 dias de infecção, observamos que animais infectados tinham expansão de células totais no linfonodo. Nós observamos que, apesar de animais BALB/c infectados apresentarem maior proporção de linfócitos B totais que animais BALB/c naives, ambas as linhagens apresentaram mesma porcentagem e número de linfócitos B totais. Observamos

também que animais C57BL/6 infectados apresentaram menor porcentagem de células B de centro germinativo que animais BALB/c infectados. Sabemos que os linfócitos B de centro germinativo são células que têm a capacidade de produzir anticorpos de alta afinidade e estão associadas com a memória imunológica para a defesa do hospedeiro contra patógenos (HAMEL, K. et al., 2012). Além disso, dados prévios do nosso grupo associaram os anticorpos à patogênese na infecção com *L. amazonensis* (FIRMINO-CRUZ, et al., 2019). Com os resultados obtidos, podemos sugerir que a produção de anticorpos de alta afinidade pode estar associada com a patogênese durante a infecção, já que animais BALB/c, que são suscetíveis a infecção, possuem uma proporção maior desses linfócitos. Por outro lado, a baixa porcentagem desses linfócitos em animais C57BL/6, gera consequentemente uma produção menor de anticorpos, o que explicaria a resistência parcial à infecção por *L. amazonensis*. Em relação ao número, não observamos diferenças entre as linhagens, mas animais infectados de cada grupo apresentaram maior número que animais naives. Por outro lado, animais C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* ( cepa LTB0016) não apresentaram diferenças no número de células B de centro germinativo em linfonodos em comparação aos animais naives (GIBSON-CORLEY KN et al., 2009), o que sugere que a diferença no número de linfócitos B de centro germinativo no linfonodo pode ser cepa específica. Na literatura é descrito que células B expressando CD1d podem apresentar lipídio exógeno ou endógeno às células NKT que são capazes de regular, aumentar e sustentar as respostas imunes humorais (CHAUDHRY, MS. et al., 2014). Foi descrito que células B hepáticas em camundongos C57BL/6 infectados com *L. donovani* não exibem fenótipo regulatório, e camundongos infectados apresentam uma proporção menor de linfócitos B que expressam CD1d que camundongos naives ( MOORE JWJ. et al., 2012). Por outro lado, células B que expressam CD1d também são capazes de produzir IL-10 *in vivo* após infecção de camundongos BALB/c com *L. major*. Decidimos então a partir dessas informações observar também essa população de células B que expressam CD1d nos dois modelos. Observamos que animais C57BL/6 e BALB/c naives apresentaram maior proporção de linfócitos B que expressam CD1d que animais infectados, isso pode estar associado com o fato de que durante a infecção, a expressão de CD1d por linfócitos B pode ser modulada pela sinalização aumentada ao receptor de linfócitos B (BCR) e uma internalização aumentada do CD1d nessas células (CHAUDHRY, MS. et al., 2014). Por outro lado, não observamos diferenças nas porcentagens e números dessas células B expressando CD1d entre os dois modelos, porém animais infectados apresentavam maior número que animais naives. Avaliamos também linfócitos B que expressavam PD-L1. Sabe-se que o PD-L1 é expresso por células B e que está associado à progressão da lesão e aumento da carga parasitária em



camundongos 129sv infectados com *L. mexicana* (SPENCER C. LIANG et al., 2005). Além disso, células B que expressam PD-L1 ou IL-10 podem suprimir a função das células T *ex vivo* no modelo de leishmaniose visceral canina e o bloqueio de PD-L1 específico para células B restaura as respostas Th1 (SCHAUT RG et al. 2016). Dados prévios do nosso grupo demonstram também que camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com anti-PD-1 e anti-PD-L1 tiveram um aumento significativo das células T CD4 + e CD8 + produtoras de IFN- $\gamma$  e diminuição da resposta Th2 com a inibição de IL-4 e TGF- $\beta$  (DA FONSECA-MARTINS, AM et al., 2019). Nossos dados mostraram que os animais C57BL/6 infectados tiveram menor porcentagem de expressão de PD-L1 nos linfócitos B em comparação aos animais BALB/c infectados, e animais BALB/c infectados apresentaram maior porcentagem que animais BALB/c naives. Considerando que o PD-L1 está associado então a uma resposta Th2, com exaustão dos linfócitos T e diminuição de IFN- $\gamma$  consequentemente suprimindo a resposta Th1, podemos entender o motivo do modelo BALB/c ser mais suscetível à infecção em comparação ao modelo C57BL/6. Em contraste, não observamos diferenças no número de células entre os modelos, porém animais infectados de ambos os grupos apresentavam maior número que animais naives. Já foi descrito que a expressão elevada de TIM-3 em células dendríticas ajuda a diminuir a população de células dendríticas do tipo 1 (cDC1) e aumentar a abundância de células dendríticas do tipo 2 (cDC2), o que consequentemente leva ao aumento de respostas Th2 promotoras da doença, em camundongos BALB/c cronicamente infectados com *L. donovani* (MISHRA, M., et al 2023). Decidimos então avaliar a expressão de TIM-3 por células B durante a infecção por *L. amazonensis* nos dois modelos. Com proporções menores que 0.04%, nossos dados não sugerem diferenças significativas entre os modelos, nem na proporção e nem no número de linfócitos B que expressam TIM-3. Vale ressaltar que a diferença também não foi observada entre animais naives e infectados de cada grupo. Células B reguladoras são capazes de expressar TIM-1, que é uma molécula co-estimuladora que regula as respostas imunes e tem a capacidade de modular a diferenciação efetora das células T CD4 e promovem a resposta Th2 ( DING Q et al., 2011), portanto, nossas análises precisam se estender para esse marcador para entender o seu perfil em ambos os modelos. As células B são capazes de produzir IL-10 em camundongos BALB/c infectados e a IL-10 está envolvida na indução de uma resposta de células Th2 e na suscetibilidade a *L. major* em camundongos BALB/c. (CATHERINE RONET et al., 2010). Dados prévios do nosso grupo sugerem que os linfócitos B em camundongos BALB/c podem estar associados à infecção por *L. amazonensis* como um fator imunossupressor justamente por sua capacidade de produzir anticorpos e IL-10 (FIRMINO-CRUZ, et al., 2019). Nossos dados

demonstram que animais BALB/c apresentavam maior proporção de linfócitos B que expressam IL-10 que animais C57BL/6. Porém não foi observada diferenças no número entre os grupos, mas observamos que animais infectados apresentavam maior número que animais naives em ambos os grupos. Após 59 dias, avaliando as populações de células B no linfonodo drenante, percebemos que enquanto as lesões estavam começando a se diferenciar, não havia diferença na proporção de linfócitos B totais entre os modelos, mas quando as lesões estavam em tamanhos diferentes, animais C57BL/6 infectados apresentaram maior porcentagem de linfócitos B totais que animais C57BL/6 naives e maior porcentagem e número que animais BALB/c infectados. Animais infectados de ambos os grupos apresentaram maior número de linfócitos B totais que animais naives. Já em relação aos linfócitos B de centro germinativo, animais BALB/c apresentaram maior porcentagem que animais C57BL/6, o que sugere uma proporção maior de linfócitos B capazes de produzir anticorpos de alta afinidade nestes animais, porém não observamos diferenças em relação ao número entre os modelos. Observamos também que animais BALB/c infectados apresentaram maior número dessas células B de centro germinativo em relação a BALB/c naives. Avaliando a expressão de CD1d por linfócitos B, observamos que animais C57BL/6 apresentaram maior porcentagem que animais BALB/c, porém menor número. Também observamos que animais BALB/c naives apresentavam maior número que animais infectados. Não foi observada diferença na porcentagem de linfócitos B que expressam PD-L1 entre as linhagens, porém, animais BALB/c infectados apresentavam maior porcentagem que animais BALB/c naives, pois a infecção no modelo BALB/c induz a expressão de PD-L1, que aumenta a resposta Th2 através da exaustão de linfócitos T (DA FONSECA-MARTINS, AM et al., 2019). Além disso, animais C57BL/6 apresentaram maior número em comparação aos animais BALB/c, e observamos também que animais infectados de ambos os grupos apresentaram maior número em relação aos animais naives. Não foi observada diferença entre os grupos na proporção e número de linfócitos B que expressam IL-10, mas animais BALB/c naives apresentavam maior porcentagem que animais BALB/c infectados, porém menor número. Além disso, animais C57BL/6 infectados apresentaram maior número em relação a animais C57BL/6 naives. Existe a necessidade de repetir a análise de linfócitos B produtores de IL-10 pois não conseguimos identificar esse estímulo no atual trabalho.

Já no sítio da lesão, após 38 dias, observamos que os modelos BALB/c e C57BL/6 apresentavam a mesma porcentagem de linfócitos B totais, linfócitos B que expressam CD1d, PD-L1, TIM-3 e IL-10. Por outro lado, observamos que animais BALB/c

infectados apresentaram maior porcentagem de linfócitos B que expressam IL-10 e PD-L1 que animais naives e animais C57BL/6 infectados apresentaram maior proporção de linfócitos B que expressam PD-L1 que animais naives. Já com 59 dias, no sítio da infecção, não observamos diferenças na porcentagem de linfócitos B totais ou linfócitos B que expressam CD1d, PD-L1 e IL-10.

Dados prévios do nosso grupo demonstraram que a produção de anticorpos poderia estar associada à patogênese durante a infecção por *Leishmania* (FIRMINO-CRUZ, et al., 2018), conforme demonstrado em camundongos  $\beta 2m^{-/}$ , que possuem níveis baixos de anticorpos, após serem infectados com *L. mexicana*, conseguiram controlar a progressão da lesão e reduzir a carga parasitária (BUXBAUM LU et al., 2005). Nós então avaliamos a produção de anticorpos entre os modelos. Sabemos que IgG1 é patogênico em infecção por *L. mexicana*, pois animais deficientes na produção de IgG1 apresentaram resistência a infecção em comparação com animais WT (CHU N, THOMAS BN, PATEL SR, BUXBAUM LU., 2010). Aqui, demonstramos que animais BALB/c apresentam níveis maiores de IgG1 e IgM em comparação a animais C57BL/6. IgG1 está relacionado com uma resposta do tipo 2 que é o perfil de resposta apresentado pelo modelo BALB/c. Por outro lado, animais C57BL/6 apresentaram níveis maiores de IgG2c em comparação a animais BALB/c. Este isotipo está relacionado com uma resposta do tipo 1, que é observada no modelo C57BL/6 (POTEET et al., 2015). Porém, a infecção de animais C57BL/6 com parasitos de *L. amazonensis* (cepa LTB0016) não induziu a produção de IgG2c (GIBSON-CORLEY KN et al., 2012), o que sugere que a produção de IgG2c no C57BL/6 pode ser cepa específica. Não observamos produção de IgE e IgA por ambos os modelos nas diluições analisadas e não vimos diferença nos níveis de IgG, IgG2a e IgG2b. Entendemos que existe a necessidade de repetir a quantificação de IgG2a/c, pois não observamos diferenças entre os grupos. Com esses dados, podemos indicar que a produção de IgG1 nos animais susceptíveis BALB/c pode estar associada à patogênese observada nesses animais. Em adendo, os dados podem indicar que o anticorpo IgG2c ( que está relacionado a uma resposta do tipo 1) pode estar associado com o melhor prognóstico da doença.

Animais  $\mu$ MT possuem uma mutação na cadeia  $\mu$  da cadeia pesada de anticorpos, o que resulta em BCRs não funcionais. Isso faz com que os linfócitos B em desenvolvimento falhem na seleção positiva, levando à falta de linfócitos B nestes animais. Camundongos BALB/c  $\mu$ MT infectados com *L. major* foram resistentes à infecção, o que sugere que os linfócitos B apresentam perfil patogênico na infecção por *L. major* no modelo BALB/c (CATHERINE RNET et al, 2010). Utilizando transgênicos de C57BL/6, conseguimos avaliar o papel dos

linfócitos B nesse modelo parcialmente resistente. Com isso, infectamos animais C57BL/6 WT e animais  $\mu$ MT com parasitos de *L. amazonensis* em paralelo. Nossos dados sugerem que os linfócitos B não tem influência na infecção por *L. amazonensis* no C57BL/6, já que animais deficientes em linfócitos B desenvolveram o mesmo perfil de lesão e carga parasitária que animais selvagens. Portanto, concluímos que o  $\mu$ MT no animal resistente não contribui nem para os processos de lesão e nem para os processos de resolução. Já foi descrito que a IL-10 produzida pelas células B está envolvida na indução de uma resposta de células Th2 e na suscetibilidade a *L. major* em camundongos BALB/c (Catherine Ronet et al, 2010). Para entender o papel da IL-10 no modelo C57BL/6, infectamos animais C57BL/6 deficientes na produção de IL-10 e animais C57BL/6 WT em paralelo. Nossos dados indicam que animais IL-10<sup>-/-</sup> tiveram uma lesão maior e carga parasitária elevada em comparação a animais selvagens, o que sugere que esta citocina pode ser importante para controlar o desenvolvimento da lesão e carga parasitária no sítio da infecção na infecção por *L. amazonensis* no modelo C57BL/6.

## 8 – Conclusão

De modo geral, concluímos que os linfócitos B parecem não participar da progressão da lesão e nem do processo de resolução dessas lesões em animais C57BL/6 e que a citocina IL-10 pode ser importante para o controle da lesão e carga parasitária. Após 38dpi ou 59dpi, animais BALB/c apresentaram proporção maior de linfócitos B de centro germinativo, que estão associados com a produção de anticorpos de alta afinidade, que por sua vez, podem ser associados com a patogênese durante a infecção no animal suscetível (BALB/c). Com lesões começando a se diferenciar, animais BALB/c apresentaram proporção maior de linfócitos B expressando PD-L1, que está associado com a exaustão de linfócitos T. Também observamos que a produção de IgG1 pode estar associada à patogênese observada em animais BALB/c e que o anticorpo IgG2c pode estar associado com o melhor prognóstico da doença.

## PERSPECTIVAS

Temos como perspectivas purificar anticorpos de animais BALB/c e transferir para animais C57BL/6 e observar se agrava a lesão no animal C57BL/6. Também pretendemos fazer um modelo de animal F1, cruzando um animal BALB/c com um animal C57BL/6. Após isso, sortaremos células B de animais BALB/c e C57BL/6 infectados para inocular no animal F1 e observaremos qual será o perfil da lesão e resposta imune. Pretendemos repetir a infecção em animais  $\mu$ MT porém com uma concentração menor de parasitos para observar se terá diferenças, pois acreditamos que talvez utilizando uma concentração menor poderemos observar alguma diferença. Por fim, pretendemos também sortar células B expressando PD-L1 e células B não expressando PD-L1 e fazer uma co-cultura com células T para provar se a célula B expressando PD-L1 tem capacidade de supressão de linfócitos T.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMPREY, J. L., IM, J. S., TURCO, S. J., MURRAY, H. W., ILLARIONOV, P. A., BESRA, G. S., ... & SPÄTH, G. F. (2004). A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *The Journal of experimental medicine*, 200(7), 895-904;
- ANAM, K., AFRIN, F., BANERJEE, D., PRAMANIK, N., GUHA, S. K., GOSWAMI, R. P., ... & ALI, N. (1999). Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian kala-azar patients after chemotherapy. *Infection and immunity*, 67(12), 6663-6669.;
- ANTONELLI, L. R., et al. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clinical Exp Immunol*. 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2004.02426.x;
- ARCANJO, A. F. et al. B-1 cells modulate the murine macrophage response to *Leishmania major* infection. v. 0682, n. 2, 2017a;

- ARCANJO, A. F. et al. Dependency of B-1 cells in the maintenance of splenic interleukin-10 producing cells and impairment of macrophage resistance in visceral leishmaniasis. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. JUN, p. 1–7, 2017b;
- BAUMGARTH, N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Reviews Immunology*, 11(1), 34-46;
- BENNIS, I. et al. Psychosocial impact of scars due to cutaneous leishmaniasis on high school students in Errachidia province, Morocco. *Infectious Diseases of Poverty*, v. 6, n. 1, p. 46, 7 abr. 2017;
- BOURREAU E., et al. LACK-specific CD4(+) T cells that induce gamma interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. *Infect Immun*. 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.6.3122-3129.2002;
- BURZA S, CROFT SL, BOELAERT M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018 Sep 15;392(10151):951-970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30126638;
- BUXBAUM, L. U., SCOTT, P. Interleukin 10- and Fc Receptor-Deficient Mice Resolve *Leishmania mexicana* Lesions. v. 73, n. 4, p. 2101–2108, 2005;
- CANCHÉ-POOLEB, CANTO-HAU DM, VARGAS-MELÉNDEZ MA, TELLO-MARTÍN R, REYES-NOVELO E, et al., Report of autochthonous cases of localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* in vulnerable, susceptible areas of Southeastern Mexico. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2022 May 25;64:e35. doi: 10.1590/S1678-9946202264035. PMID: 35648988, PMCID: PMC9134861;
- CHAUDHRY, M. S., & KARADIMITRIS, A. (2014). Role and regulation of CD1d in normal and pathological B cells. *The Journal of Immunology*, 193(10), 4761-4768.;
- CHRISTENSEN S.M., et al. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. *PloS Negl Trop Disis*. 2019 DOI:10.1371/journal.pntd.0007152;
- CHU, N. et al. IgG1 Is Pathogenic in *Leishmania mexicana* Infection. *The Journal of Immunology*, v. 185, n. 11, p. 6939–6946, 2010;
- COLMENARES, M. et al. *Leishmania pifanoi* pathogenesis: Selective lack of a local cutaneous response in the absence of circulating antibody. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 12, p. 6597–6605, 2002;

COSSARIZZA, A., CHANG, HD, RADBRUCH, A., AKDIS, M., ANDRĂ, I., ANNUNZIATO, F., ET AL (2017). Diretrizes para o uso de citometria de fluxo e separação de células em estudos imunológicos. *Jornal europeu de imunologia* , 47 (10), 1584-1797. <https://doi.org/10.1002/eji.201646632>;

DA FONSECA-MARTINS, A. M., DE SOUZA LIMA-GOMES, P., ANTUNES, M. M., DE MOURA, R. G., COVRE, L. P., CALÔBA, C., ... & DE MATOS GUEDES, H. L. (2021). Leishmania parasites drive PD-L1 expression in mice and human neutrophils with suppressor capacity. *Frontiers in Immunology*, 12, 598943;

DA FONSECA-MARTINS, A. M., RAMOS, T. D., PRATTI, J. E., FIRMINO-CRUZ, L., GOMES, D. C. O., SOONG, L., ... & DE MATOS GUEDES, H. L. (2019). Immunotherapy using anti-PD-1 and anti-PD-L1 in Leishmania amazonensis-infected BALB/c mice reduce parasite load. *Scientific reports*, 9(1), 1-13;

DEAK, E. et al. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. *European Journal of Immunology*, v. 40, n. 5, p. 1355–1368, 2010;

DING, Q., YEUNG, M., CAMIRAND, G., ZENG, Q., AKIBA, H., YAGITA, H., ... & ROTHSTEIN, DM (2011). As células B reguladoras são identificadas pela expressão de TIM-1 e podem ser induzidas por meio da ligação de TIM-1 para promover tolerância em camundongos. *The Journal of Clinical Investigation* , 121 (9).;

DORLO, T. P. C. et al. Optimal dosing of miltefosine in children and adults with visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 7, p. 3864–3872, jul. 2012;

FIRMINO-CRUZ, L. et al. B-1 lymphocytes are able to produce IL-10, but is not pathogenic during Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. *Immunobiology*, 2019.;

FIRMINO-CRUZ, L., RAMOS, T. D., DA FONSECA-MARTINS, A. M., MACIEL-OLIVEIRA, D., OLIVEIRA-SILVA, G., PRATTI, J. E. S., ... & DE MATOS GUEDES, H. L. (2018). Immunomodulating role of IL-10-producing B cells in Leishmania amazonensis infection. *Cellular Immunology*, 334, 20-30;

GAAFAR A., et al. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major. *Clin Immunol.* v. 91 p. 314-320.1999 DOI: 10.1006/clim.1999.4705;

- GERALDO, M. M. et al. In vivo and in vitro phagocytosis of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes by B-1 cells. *Parasite Immunology*, v. 38, n. 6, p. 365–376, 2016;
- GIBSON-CORLEY, K. N. et al. A deficiency in the B cell response of C57BL/6 mice correlates with loss of macrophage-mediated killing of *Leishmania amazonensis*. *International Journal for Parasitology*, v. 40, n. 2, p. 157–161, 2010.;
- GIBSON-CORLEY, K. N. et al. An in vitro model of antibody-enhanced killing of the intracellular parasite *leishmania amazonensis*. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. 1–8, 2014.;
- GIBSON-CORLEY, K. N., BOGGIATTO, P. M., BOCKENSTEDT, M. M., PETERSEN, C. A., WALDSCHMIDT, T. J., & JONES, D. E. (2012). Promotion of a functional B cell germinal center response after *Leishmania* species co-infection is associated with lesion resolution. *The American journal of pathology*, 180(5), 2009-2017.;
- GONZAGA, W. F. K. M. et al. B-1 cells contribute to susceptibility in experimental infection with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Parasitology*, v. 142, n. 12, p. 1506–1515, 2015;
- GONZAGA, W. F. K. M. et al. B-1 cells contribute to susceptibility in experimental infection with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Parasitology*, v. 142, n. 12, p. 1506–1515, 2015.;
- GONZAGA, W. F. K. M. et al. Evaluation of Experimental Infection with *L. (L.) amazonensis* in X-Linked Immunodeficient Mice. *Journal of Parasitology*, v. 103, n. 6, p. 708–717, 2017.;
- GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009;
- GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009;
- HAMEL, K. M., LIARSKI, V. M., & CLARK, M. R. (2012). Germinal center B-cells. *Autoimmunity*, 45(5), 333-347.;
- HEINZEL, F. P. et al. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, n. 16, p. 7011–7015, 1991;



- HOERAUF, A. et al. Effect of IL-7 treatment on *Leishmania major*-infected BALB.Xid mice: enhanced lymphopoiesis with sustained lack of B1 cells and clinical aggravation of disease. *International immunology*, v. 7, n. 11, p. 1879–1884, 1995.;
- HOERAUF, A. et al. The xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. *International Immunology*, v. 6, n. 8, p. 1117– 1124, 1994.;
- HOERAUF, A. et al. The xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. *International Immunology*, v. 6, n. 8, p. 1117– 1124, 1994.;
- HURRELL, B. P., REGLI, I. B.; KLEIN, U., & DALLA-FAVERA, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology*, 8(1), 22-33;
- LIANG, S., GREENWALD, R., LATCHMAN, Y., ROSAS, L., SATOSKAR, A., FREEMAN, G. E SHARPE, A. (2006), PD-L1 e PD-L2 têm papéis distintos na regulação Imunidade do hospedeiro à leishmaniose cutânea. *EUR. J. Immunol.*, 36: 58-64. <https://doi.org/10.1002/eji.200535458>;
- MESQUITA JÚNIOR, D., ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T. T., SOUZA, A. W. S. D., CRUVINEL, W. D. M., ANDRADE, L. E. C., & SILVA, N. P. D. (2010). Sistema imunitário- parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50, 552-580;
- MESTECKY, J. Structure of antibodies. *J. oral Path.*, v. 1, p. 288–300, 1972;
- MISHRA, M., YADAV, M., KUMAR, S., KUMAR, R., & SEN, P. (2023). TIM-3 increases the abundance of type-2 dendritic cells during *Leishmania donovani* infection by enhancing IL-10 production via STAT3. *Cell Death & Disease*, 14(5), 331;
- MOAFI M, REZVAN H, SHERKAT R, TALEBAN R. *Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature*. *Int J Prev Med*. 2019 Jun 7:10:95. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM\_116\_18. PMID: 31360342, PMCID: PMC6592111;
- MOHAMMADBEIGI A., et al. An investigation of the effects of environmental and ecologic factors on cutaneous leishmaniasis in the old world: a systematic review. *Environ Health*. V.36: p. 117-128, 2020. DOI: 10.1515/reveh-2020-0066;
- MOORE, J. W., BEATTIE, L., DALTON, J. E., OWENS, B. M., MAROOF, A., COLES, M. C., & KAYE, P. M. (2012). B cell: T cell interactions occur within hepatic granulomas during experimental visceral leishmaniasis. *PLoS One*, 7(3), e34143.;

MORAES, M. A., & SILVEIRA, F. T. (1994). Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 36, 459-463;

O’GARRA, A. et al. Ly-1 B ( B-1 ) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *European Journal of Immunology*, v. 22, p. 711–717, 1992;

OZBILGE, H., AKSOY, N., GUREL, M. S., & YAZAR, S. (2006). IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. *Journal of medical microbiology*, 55(10), 1329-1331.;

PALANIVEL, V. et al. B-cell outgrowth and ligand-specific production of IL-10 correlate with Th2 dominance in certain parasitic diseases. *Experimental Parasitology*, v. 84, n. 2, p. 168–177, 1996.;

PÉREZ-CABEZAS, B., CECÍLIO, P., GASPAR, T. B., GÄRTNER, F., VASCONCELLOS, R., & CORDEIRO-DA-SILVA, A. (2019). Understanding resistance vs. susceptibility in visceral leishmaniasis using mouse models of *leishmania infantum* infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 30.;

PESSÔA. S.B MARTINS A.V. (1982) *Parasitologia médica* , 11ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil: 78 - 103;

POTEET, E., LEWIS, P., LI, F., ZHANG, S., GU, J., CHEN, C., ... & YAO, Q. (2015). A novel prime and boost regimen of HIV virus-like particles with TLR4 adjuvant MPLA induces Th1 oriented immune responses against HIV. *PloS one*, 10(8), e0136862.;

PRATTI, J. E. S., RAMOS, T. D., PEREIRA, J. C., DA FONSECA-MARTINS, A. M., MACIEL-OLIVEIRA, D., OLIVEIRA-SILVA, G., ... & DE MATOS GUEDES, H. L. (2016). Efficacy of intranasal LaAg vaccine against *Leishmania amazonensis* infection in partially resistant C57Bl/6 mice. *Parasites & vectors*, 9(1), 1-11;

READY, P. D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical epidemiology*, 147-154; REINER, S. L. LOCKSLEY, R. M. The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*. *Annual Review of Immunology*, v. 13, n. 1, p. 151–177, 1995;

RONET C, HAUYON-LA TORRE Y, REVAZ-BRETON M., et al. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major*

through IL-10 production. *J. Immunol.* V. 184, p. 886–894, 2010. DOI: 10.4049/jimmunol.0901114;

RONET, C., TORRE, YHL, REVAZ-BRETON, M., MASTELIC, B., TACCHINI-COTTIER, F., LOUIS, J., & LAUNOIS, P. (2010). Células B reguladoras moldam o desenvolvimento de respostas imunes Th2 em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major* através da produção de IL-10. *The Journal of Immunology* , 184 (2), 886-894.;

SAINI, P., KUMAR, N. P., AJITHLAL, P. M., JOJI, A., RAJESH, K. R., REENA, K. J., & KUMAR, A. (2020). Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani* Zymodeme MON-37, Western Ghats, India. *Emerging Infectious Diseases*, 26(8), 1956;

SAÚDE, B. O que são anticorpos e qual é sua importância para a saúde humana? Disponível em: <https://beepsaude.com.br/o-que-sao-anticorpos/>;

SCHAUT, R. G. ET AL. Regulatory IgD hi B Cells Suppress T Cell Function via IL-10 and PD-L1 during Progressive Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 196, n. 10, p. 4100–4109, 2016;

SCHAUT, R. G., LAMB, I. M., TOEPP, A. J., SCOTT, B., MENDES-AGUIAR, C. O., COUTINHO, J. F., ... & PETERSEN, C. A. (2016). Regulatory IgDhi B cells suppress T cell function via IL-10 and PD-L1 during progressive visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 196(10), 4100-4109.;

SCOTT, P. et al. Role of Cytokines and CD4+ T- Cell Subsets in the Regulation of Parasite Immunity and Disease. *Immunological Reviews*, v. 112, n. 1, p. 161–182, 1989;

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

SHARMA, N. L., MAHAJAN, V. K., KANGA, A., SOOD, A., KATOCH, V. M., MAURICIO, I., ... & SHARMA, R. C. (2005). Localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica*: preliminary findings of the study of 161 new cases from a new endemic focus in himachal pradesh, India. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 72(6), 819-824;

SHEN, P. et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*, v. 507, n. 7492, p. 366–370, 2014;

SMELT, S. C. et al. B Cell-Deficient Mice Are Highly Resistant to *Leishmania donovani* Infection, but Develop Neutrophil-Mediated Tissue Pathology. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 7, p. 3681–3688, 2000.;

SOONG, L. et al. Role of CD4<sup>+</sup> T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol*, v. 158, n. 11, p. 5374–5383, 1997;

SOONG, L. HENARD, C. A. MELBY, P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis *Seminars in Immunopathology*, nov. 2012;

SUNDAR, S., CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010;

TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions *Trends in Parasitology* Elsevier Ltd, , 1 maio 2016;

UNANUE, E. R., ALLEN, P. M. The Basis for the Immunoregulatory Role of Macrophages and Other Accessory Cells. *Science*, v. 236, n. 4801, p. 551–557, 1978;

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, v. 13, n. 3, p. 191–200, 1 mar. 2015;

WANASEN, N., XIN, L., SOONG, L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *International Journal for Parasitology*, v. 38, n. 3–4, p. 417–429, 2008.

YANIK, M. et al. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*, v. 29, n. 5, p. 464–467, 2004