

LETÍCIA NUNES DE SOUSA

O PAPEL DE CÉLULAS GAMA-DELTA ($\gamma\delta$) NA
INFECÇÃO POR *LEISHMANIA AMAZONENSIS* EM
CAMUNDONGOS C57BL/6



**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Microbiologia
Paulo de Góes, da Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia e
Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2023

Trabalho a ser realizado no Departamento de Imunologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Herbert Leonel de Matos Guedes e coorientação de Júlio Souza Dos Santos.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

N972p Nunes de Sousa, Leticia
O Papel De Células T Gama-Delta (??) Na Infecção
Por Leishmania Amazonensis Em Camundongos C57BL/6 /
Leticia Nunes de Sousa. -- Rio de Janeiro, 2023.
44 f.

Orientador: Herbert Leonel de Matos Guedes.
Coorientador: Júlio Souza Dos SANTOS.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Leishmaniose cutânea murina. 2. C57BL/6. 3.
Células T Gama-Delta. 4. imunopatologia. I. Leonel
de Matos Guedes, Herbert , orient. II. Souza Dos
SANTOS, 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.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO(A): LETICIA NUNES DE SOUSA

DRE: 120017329

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Prof. Elvira Saraiva (Presidente)
 Prof. Ana Carolina de Siqueira Couto de Oliveira
 Prof. Kamila Guimarães Pinto
 Prof. Dirlei Nico (Suplente)

Título da Monografia: “O Papel Das Células T Gama Delta ($\gamma\delta$) Na Infecção Por *Leishmania Amazonensis* Em Camundongos C57BL/6”

Local: Anfiteatro do IMPG / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 11 de dezembro de 2023 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 11 de dezembro de 2023.

NOTA:

Banca Examinadora:

Elvira Saraiva

Prof. Elvira Saraiva (Presidente)

Prof. Ana Carolina de Siqueira Couto de Oliveira

Kamila Guimarães Pinto

Prof. Kamila Guimarães Pinto

Dirlei Nico

Prof. Dirlei Nico (Suplente)

Leticia Nunes de Sousa

Leticia Nunes de Sousa

Aluno(a):

Orientador(a)

(e coorientador):

Herbert Leonel de Matos Guedes e Júlio Souza Dôs Santos
 Profa. Herbert Leonel de Matos Guedes e Júlio Souza Dôs Santos

Coordenadora de

TCC:

Marinella Silva Laport
 Profa. Marinella Silva Laport

AGRADECIMENTO

Agradeço ao meu orientador, Herbert Guedes, pelo tempo dedicado a mim e ao meu projeto, proporcionando-me a oportunidade de aprender tanto em apenas dois anos de iniciação científica. Expresso minha gratidão especialmente ao meu co-orientador, Júlio Dos Santos, que esteve ao meu lado diariamente na bancada, renunciando a noites em família e alguns finais de semana para dedicar seu tempo ao meu projeto. Além disso, destaco sua capacidade acolhedora nos momentos em que duvidei de mim mesmo e de minha habilidade em superar obstáculos. De maneira geral, agradeço a ambos pelos desafios impostos, os quais, sem dúvida, contribuíram para meu amadurecimento e desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço imensamente à minha família pelo apoio incondicional, tanto financeiro quanto emocional, e pela compreensão diante da minha ausência em momentos turbulentos da graduação. Reconheço o estímulo constante aos estudos e a confiança depositada em mim ao longo de toda a minha jornada acadêmica. Quero expressar meu reconhecimento especial à minha irmã, Debora, que desempenhou o papel de segunda mãe, sempre exigente, mas crendo no meu potencial de ser melhor. Desde a infância, a vejo como uma grande inspiração, tanto nos estudos quanto na vida profissional e pessoal. À minha mãe, Alexsandra, agradeço pelos sacrifícios diários e constantes que possibilitaram meu comprometimento integral aos estudos nos últimos quatro anos.

Ao meu melhor amigo e namorado, Jorge, dedico minha gratidão por seu apoio incondicional durante a elaboração deste trabalho. Seja com palavras de incentivo, trazendo café nas minhas madrugadas de estudo ou indo até o fundão tarde da noite para me buscar após longas horas de experimento, serei eternamente grata.

Agradeço aos meus amigos da faculdade, em especial a Gabriel Igari, Gabriela Lisboa e Fabiane Messner, que tornaram esses quatro anos mais leves e divertidos, mesmo diante de tantos desafios e questionamentos constantes. Agradeço por seu apoio nos momentos de crise e pelas risadas compartilhadas nos momentos felizes.

À equipe do laboratório de Imunobiotecnologia, expresso minha gratidão pela colaboração fundamental que proporcionou o êxito deste projeto.

EPÍGRAFE

“Slow down you're doing fine
You can't be everything you want to be before
your time.”

(Billy Joel – Vienna)

RESUMO

LETÍCIA NUNES DE SOUSA

O PAPEL DE CÉLULAS T GAMA DELTA ($\gamma\delta$) NA INFECÇÃO POR LEISHMANIA AMAZONENSIS EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Orientador: Herbert Leonel de Matos Guedes

Co-orientador: Júlio Souza Dos Santos

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas causadas por diferentes espécies do protozoário do gênero *Leishmania*, como *Leishmania amazonensis*, agente etiológico da leishmaniose cutânea difusa no Brasil. Sua transmissão ocorre por meio do repasto sanguíneo realizado por flebotomíneos fêmea infectados. Nosso grupo já demonstrou que camundongos Sv129 são suscetíveis à infecção por *L. amazonensis* e foi observado que passam por uma expansão de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 (Dos-Santos, J. S. *et al.*, 2019). No entanto, devido a grande quantidade de camundongos knockouts e repórter no background C57BL/6, foi realizada a migração do modelo de Sv129 suscetíveis para o modelo experimental em camundongos C57BL/6 parcialmente resistentes. Dessa forma, podemos investigar diferentes contextos imunológicos, inclusive relacionados a sinalização de IL-22, IL-23 e elastase que podem impactar no papel das células T $\gamma\delta$. Portanto, o objetivo desse projeto é analisar a infecção em camundongos C57BL/6 knockout (KO) para células T $\gamma\delta$ e citocinas IL-23, IL-22 e elastase neutrofílica, nas fases crônica e no pico e comparar com camundongos controles WT. Para isso, os camundongos foram infectados pela via subcutânea no coxim plantar da pata traseira direita, com 2×10^6 parasitas de *L. amazonensis* da cepa MHOM/BR/75/Josefa. A evolução da lesão foi medida semanalmente durante todo o experimento por paquimetria. Os animais TCR delta^{-/-} e Elastase^{-/-} são parcialmente resistentes à infecção por *L. amazonensis* no pico da infecção. No entanto, quando alcançam a fase crônica da infecção apresentam similaridade na resolução da infecção. Por outro lado, IL-22 pode estar envolvida com a proteção no pico da infecção, visto que os animais IL-22^{-/-} apresentaram uma lesão mais grave se comparado aos camundongos WT (Wild type). A quantificação da carga parasitária foi feita por Ensaio de Diluição Limitante (LDA). Apesar da diferença no tamanho das lesões, não foi observado impacto na carga parasitária na pata e nos linfonodos drenantes dos diferentes camundongos utilizados. Além disso, foi realizada a citometria de fluxo para análise do perfil imunológico dos camundongos, tanto no pico quanto na fase crônica da infecção. Foi observado no pico da infecção que os animais IL-22^{-/-} e IL-23^{-/-} exibiram um aumento no número de células T $\gamma\delta$ totais e produtoras de IL-17A. Enquanto animais elastase^{-/-} e WT apresentaram maior frequência de T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ do que os animais IL-22^{-/-}. Outrossim, a produção de IL-17A e IFN- γ por células T $\gamma\delta$ parece ser independente da presença de IL-23 nessa fase da infecção.

Palavras-chave: leishmaniose; células T gama delta; C57BL/6; imunopatologia

ABSTRACT**LETÍCIA NUNES DE SOUSA****THE ROLE OF GAMMA-DELTA T CELLS ($\gamma\delta$) IN LEISHMANIA AMAZONENSIS INFECTION IN C57BL/6 MICE****Orientador: Herbert Leonel de Matos Guedes****Co-orientador: Júlio Souza Dos Santos**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Leishmaniasis are a group of neglected diseases caused by varied species of the protozoan of the genus *Leishmania*, such as *Leishmania amazonensis*, the etiological agent of diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil. Transmission occurs through the blood meal taken by infected female sandflies. Our group has previously shown that Sv129 mice are susceptible to infection by *L. amazonensis*, and it has been seen that they undergo an expansion of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells (Dos-Santos, J. S. *et al.*, 2019). However, due to the considerable number of knockout and reporter mice in the C57BL/6 background, the susceptible Sv129 model was migrated to the experimental model in partially resistant C57BL/6 mice. This allows us to investigate different immunological contexts, including those related to IL-22, IL-23, and elastase signaling, which may affect the role of $\gamma\delta$ T cells. Therefore, the aim of this project is to analyze infection in C57BL/6 mice knockout (KO) for $\gamma\delta$ T cells and the cytokines IL-23, IL-22, and neutrophil elastase, in the chronic and peak phases, and compare them with WT control mice. To achieve this, mice were subcutaneously infected in the plantar pad of the right hind paw with 2×10^6 parasites of *L. amazonensis* strain MHOM/BR/75/Josefa. The progression of the lesion was measured weekly throughout the experiment using calipers. TCR delta^{-/-} and Elastase^{-/-} mice showed partial resistance to *L. amazonensis* infection at the peak of infection. However, when they reached the chronic phase of infection, they showed similarity in infection resolution. On the other hand, IL-22 may be involved in protection at the peak of infection, as IL-22^{-/-} mice showed a more severe lesion compared to WT (Wild type) mice. Parasite load quantification was performed by Limiting Dilution Assay (LDA). Despite differences in lesion size, no impact on parasite load in the paw and lymph nodes of the different mice used was seen. Additionally, flow cytometry was performed to analyze the immunological profile of mice, both at the peak and in the chronic phase of infection. At the peak of infection, IL-22^{-/-} and IL-23^{-/-} mice exhibited an increase in the number of total $\gamma\delta$ T cells and IL-17A-producing cells, while elastase^{-/-} and WT mice showed a higher frequency of IFN- γ -producing $\gamma\delta$ T cells than IL-22^{-/-} mice. Furthermore, the production of IL-17A and IFN- γ by $\gamma\delta$ T cells appears to be independent of the presence of IL-23 in this phase of infection.

Keywords: leishmaniasis; C57BL/6; gamma-delta T cells; immunopathology

RESUMO PARA LEIGOS

LETÍCIA NUNES DE SOUSA

QUAL O PAPEL DAS CÉLULAS T GAMA DELTA ($\gamma\delta$) NA LEISHMANIOSE EM CAMUNDONGOS RESISTENTES?

Orientador: Herbert Leonel de Matos Guedes

Co-orientador: Júlio Souza Dos Santos

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por um tipo de protozoário chamado *Leishmania*, sendo elas transmitidas através da picada do mosquito-palha. No Brasil, a leishmaniose cutânea pode ser causada pela *Leishmania amazonensis*, ocasionando lesões na pele do indivíduo infectado. Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, observou-se que camundongos Sv129 são suscetíveis à infecção por *L. amazonensis*. Além disso, esses camundongos demonstraram um aumento de um tipo específico de células chamadas T $\gamma\delta$ (gama-delta), que produzem uma substância chamada IL-17. Os linfócitos T $\gamma\delta$ são células importantes na resposta imune. Dessa forma, o nosso grupo emprega o uso de camundongos geneticamente modificados que não possuem esses linfócitos, com o objetivo de compreender qual o impacto essa ausência causaria durante o curso da infecção por esse protozoário. Os animais foram infectados com o microrganismo causador da doença para e foi realizada a medição do tamanho das lesões ao longo do tempo da infecção. Também calculamos a gravidade da infecção através da quantificação dos parasitos presentes nas lesões desses animais. Assim, foi observado que os animais deficientes para as células T gama-delta desenvolveram uma lesão menor em comparação ao grupo controle. Nesse sentido, há um indicativo de que as células T $\gamma\delta$ estão associadas com o agravamento da doença. No entanto, com relação a contagem de parasitos, não foi observada diferença com relação ao grupo controle. Dessa forma, apesar dessas células afetarem o tamanho das lesões, não afetam a sobrevivência do protozoário no hospedeiro.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferentes manifestações clínicas da Leishmaniose.
- Figura 2.** O ciclo de vida de *Leishmania spp.*
- Figura 3.** Células T $\gamma\delta$ e Elastase Neutrófila agravam a lesão em camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis*.
- Figura 4.** Os animais infectados por *Leishmania amazonensis* apresentaram um perfil similar na carga parasitária por grama de tecido.
- Figura 5.** Os animais IL-23^{-/-} infectados por *Leishmania amazonensis* apresentaram maior celularidade.
- Figura 6.** Os animais Elastase^{-/-} infectados por *L. amazonensis* exibiram uma diminuição na frequência e número de células T $\gamma\delta$ totais.
- Figura 7.** Os animais IL-23^{-/-} infectados por *L. amazonensis* apresentaram expansão de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17A.
- Figura 8.** Os animais IL-23^{-/-} infectados por *L. amazonensis* apresentaram expansão de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ .
- Figura 9.** Os animais IL-23^{-/-} infectados apresentaram maior número de células T CD4⁺ produtoras de IL-17
- Figura 10.** Os animais IL-23^{-/-} infectados por *Leishmania amazonensis* apresentaram expansão de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ
- Figura 11.** Os animais IL-23^{-/-} exibiram maior número e frequência de células T CD8⁺ produtoras de IL-17A⁺
- Figura 12.** Os animais IL-23^{-/-} apresentaram expansão de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ
- Figura 13.** IL-22 pode estar envolvida com a proteção em animais infectados por *L. amazonensis* no pico da infecção.
- Figura 14.** Os animais IL-22^{-/-} infectados por *Leishmania amazonensis* apresentaram maior celularidade
- Figura 15.** Análise da frequência e número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no pico da infecção
- Figura 16.** Os animais IL-22^{-/-} e IL-23^{-/-} infectados por *Leishmania amazonensis* tiveram um aumento no número de células T $\gamma\delta$
- Figura 17.** Os animais IL-23^{-/-} e IL-22^{-/-} infectados por *L. amazonensis* apresentaram expansão no número de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17A
- Figura 18.** Os animais Elastase^{-/-} e WT apresentaram maior frequência de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ se comparados aos animais IL-22^{-/-}

- Figura 19.** Os animais Elastase^{-/-} infectados demonstraram maior frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A
- Figura 20** Os animais Elastase^{-/-} apresentaram maior frequência e número de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ
- Figura 21.** Os animais Elastase^{-/-} infectados apresentaram expansão de células T CD8⁺ produtoras de IL-17^a
- Figura 22.** Os animais infectados IL-23^{-/-}, IL-22^{-/-} exibiram diminuição na frequência de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ .

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LC – Leishmaniose cutânea

LV – Leishmaniose Visceral

Th – “T helper”

IL – Interleucina

IFN – Interferon

$\gamma\delta$ – Gama-delta

KO – “Knockout”

WT – “Wild type”

PAMPS – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

LDA – “Limited Dilution Assay”

SFB – Soro fetal bovino

M199 – Meio 199

PBS - “phosphate-buffered saline”

ILC3 - célula linfóide inata do tipo 3

NE - “Neutrophil elastase”

HMBPP - “(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate”

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
RESUMO PARA LEIGOS	ix
LISTA DE FIGURAS	x-xi
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1-11
1.1 As leishmanioses	1-2
1.2 Epidemiologia das leishmanioses	2-3
1.3 O protozoário e seu ciclo de vida	3-4
1.4 Imunobiologia das leishmanioses	4-11
1.4.1 Eixo IL-17/elastase neutrofílica na leishmaniose	5-6
1.4.2 IL-23, IL-22 e IL-17 na leishmaniose	6-7
1.6 As células T $\gamma\delta$ (Gama-delta)	7-10
1.7 As células T $\gamma\delta$ (Gama-delta) e as leishmanioses	10-11
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivos específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12-14
4.1 Animais	12
4.2 Parasito	12
4.3 Infecção e paquimetria	12-13
4.3.1 Lavagem e contagem da <i>Leishmania amazonensis</i>	13
4.3.2 Infecção e acompanhamento da lesão	13
4.4 Ensaio de Diluição Limitante (LDA)	13-14
4.5 Citometria de Fluxo	14
5. RESULTADOS	14-34
6. DISCUSSÃO	35-39
7. CONCLUSÕES	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40-47

1. INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas causadas por diferentes espécies do protozoário do gênero *Leishmania*. Podem apresentar diversas manifestações clínicas de acordo com a espécie do parasita e são divididas principalmente em Leishmaniose Cutânea (LC), também conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana, e Leishmaniose Visceral (LV) (OMS, 2023).

A Leishmaniose Tegumentar é a forma mais comumente encontrada no Brasil e costuma afetar a pele ou algumas regiões de cartilagem, como o nariz e o palato (Ministério da Saúde, 2022). A Leishmaniose Tegumentar Americana pode ser subdividida em três formas clínicas: difusa, mucosa e localizada, que serão mais detalhadamente descritas ao longo deste tópico.

A Leishmaniose Cutânea Difusa é uma forma mais grave e rara, caracterizada pela presença de vários nódulos ao longo do corpo. Além disso, é importante mencionar que em pacientes imunocomprometidos as lesões podem reaparecer mesmo após o tratamento, tornando-se uma patologia crônica. No Brasil, é causada principalmente por *L. amazonensis* (Teixeira, 2013).

Outrossim, a Leishmaniose Cutânea Mucosa é caracterizada por ocorrer como resultado de um caso prévio de leishmaniose cutânea localizada, principalmente se o tratamento tiver sido inadequado. Pode se manifestar meses ou anos após a infecção inicial e suas lesões são destrutivas, restritas à face e direcionadas para as áreas de cartilagem. É causada principalmente por *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (Llanos-Cuentas, 1984; Miranda Lessa, 2007; Teixeira, 2013).

No Brasil, a Leishmaniose Cutânea Localizada é causada principalmente por *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*. Nessa forma clínica, a lesão cutânea se desenvolve a partir do local onde o flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo. Essa lesão costuma ser indolor, arredondada, com bordas elevadas, podendo apresentar úlcera ou não (Teixeira, 2013; Torres-Guerrero *et al*, 2017).

Sob outro contexto, a leishmaniose visceral é a forma mais grave e, se não for tratada, pode levar o indivíduo ao óbito. Por se tratar de uma forma sistêmica que acomete o fígado, baço e até a medula, os pacientes podem apresentar perda de peso, febre, hepatoesplenomegalia e anemia severa. É causada principalmente por *L. infantum* na América (Ministério da Saúde, 2023; Teixeira, 2013).

Apesar da ampla variedade de formas clínicas e espécies causadoras desta infecção, nesse projeto daremos enfoque a *Leishmania amazonensis*, espécie capaz de causar a leishmaniose cutânea difusa, mucosa e difusa.

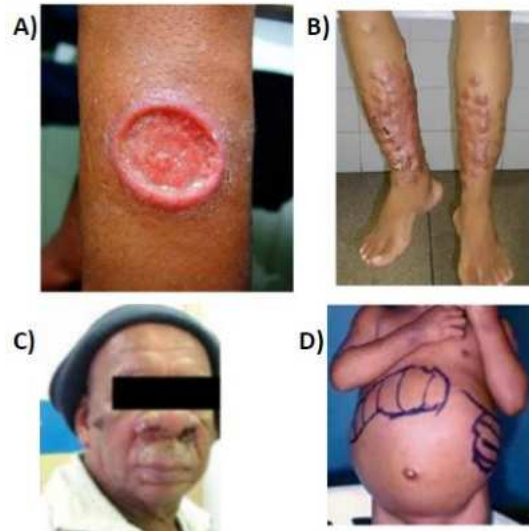


Figura 1 - Diferentes manifestações clínicas de Leishmaniose. A) Leishmaniose Cutânea Localizada (Foto de J. Costa, CPqGM/FIOCRUZ, Bahia) B) Leishmaniose Cutânea Difusa (Foto de J. Costa, CPqGM/FIOCRUZ, Bahia) C) Leishmaniose Cutânea Mucosa (Foto de J. Costa, CPqGM/FIOCRUZ, Bahia) D) Leishmaniose Visceral (Ministério da saúde)

1.2 Epidemiologia

As leishmanioses são causadas por mais de 20 diferentes espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Torres-Guerrero *et al*, 2017). A transmissão dessas doenças ocorre por meio do repasto sanguíneo de flebotomíneos fêmeas infectadas, e esse vetor é popularmente conhecido como o "mosquito-palha" (Bates, 2007). Além da variedade de espécies causadoras da infecção, também há uma diversidade de vetores desempenha um papel na transmissão desse parasito, com as espécies de insetos dos gêneros *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo) sendo os principais responsáveis por transmitir a doença (De Vries, 2022; WHO, 2023).

Esse grupo de doenças é endêmico em quase 100 países, dos quais 89 são considerados endêmicos para a leishmaniose cutânea (Reithinger *et al.*, 2007., OPAS/OMS, 2023). É importante ressaltar que, dentre os nove países responsáveis por notificar até 85% dos casos de leishmaniose cutânea, três deles estão localizados nas Américas, sendo eles: Brasil, Colômbia e Peru (OPAS/OMS, 2023). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para a leishmaniose, e estima-se que ocorram anualmente cerca de 30.000 novos casos de leishmaniose visceral e mais de 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea (WHO, 2023).

Vale ressaltar que as leishmanioses constituem um grupo de doenças antroponóticas, isso significa que o seu ciclo de transmissão da doença envolve tanto seres humanos quanto animais não humanos, como cães (OPAS/OMS, 2023). Essa característica dificulta o controle eficaz da transmissão da doença, visto que os cães infectados servem como reservatórios do parasito e podem contribuir para a manutenção da doença em áreas endêmicas. Além disso, a presença de cães infectados pode aumentar o risco de transmissão para os seres humanos, tornando a leishmaniose uma preocupação de saúde pública.

1.3 O protozoário e seu ciclo de vida

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios pertencentes à família dos Tripanossomatídeos (WHO, 2023). *Leishmania spp* possui um ciclo de vida complexo que envolve diferentes hospedeiros definitivos e intermediários. Os seres humanos são considerados hospedeiros definitivos, nos quais o parasito é capaz de causar a doença. No entanto, determinados animais também podem funcionar como reservatórios do parasita, o que significa que eles podem abrigar o protozoário em seus corpos sem desenvolver a doença ou apresentar sintomas leves (Hommel *et al.*, 1995). Esses protozoários são encontrados em duas principais formas evolutivas: a amastigota, que reside no hospedeiro mamífero, e a promastigota, que é restrita aos flebotomíneos ou pode ser cultivada em laboratório (Bates *et al.*, 1994).

Quando a fêmea do inseto vetor realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, previamente infectado, adquire dessa maneira as formas amastigotas presentes no hospedeiro. As formas amastigotas chegam ao intestino do flebótomo e, em seguida, sofrem uma série de diferenciações até se tornarem promastigotas, atingindo sua forma mais infectiva, que é a promastigota metacíclica (Bates *et al.*, 2007).

Uma vez na forma metacíclica, as formas promastigotas são armazenadas na probóscide, que durante o próximo repasto sanguíneo serão regurgitadas pelo inseto vetor, juntamente com uma mistura de proteínas salivares e microbiota do intestino do vetor (Abdeladhim *et al.*, 2014; Dey *et al.*, 2018). As promastigotas metacíclicas, penetram no hospedeiro vertebrado e, dessa forma, se transformam em amastigotas intracelulares, que se multiplicam, levando à infecção de outras células e ao desenvolvimento da doença.

É importante mencionar que, após a infecção, as células fagocíticas, como os monócitos e os neutrófilos, são as primeiras a serem recrutadas ao local da infecção (Peters *et al.*, 2008). Por se tratar de um parasito intracelular obrigatório, é capaz de sobreviver e se multiplicar em células do sistema fagocítico mononuclear, mais especificamente nos

fagolisossomos de macrófagos (Vasconcelos *et al.*, 2014). Dessa maneira, consegue utilizar mecanismos próprios para modular as vias de sinalização das células hospedeiras, inibindo a produção de citocinas e evadindo a resposta imune (Junghae, 2002).

O recrutamento dos neutrófilos pode estar relacionado à presença das proteínas salivares do vetor, uma vez que já foi relatado na literatura que elas são importantes quimioatraentes para neutrófilos (Guimarães-Costa *et al.*, 2021). Apesar disso, os macrófagos são os principais hospedeiros desse parasito, possivelmente devido ao período curto de vida dos neutrófilos (Antoine *et al.*, 1998).

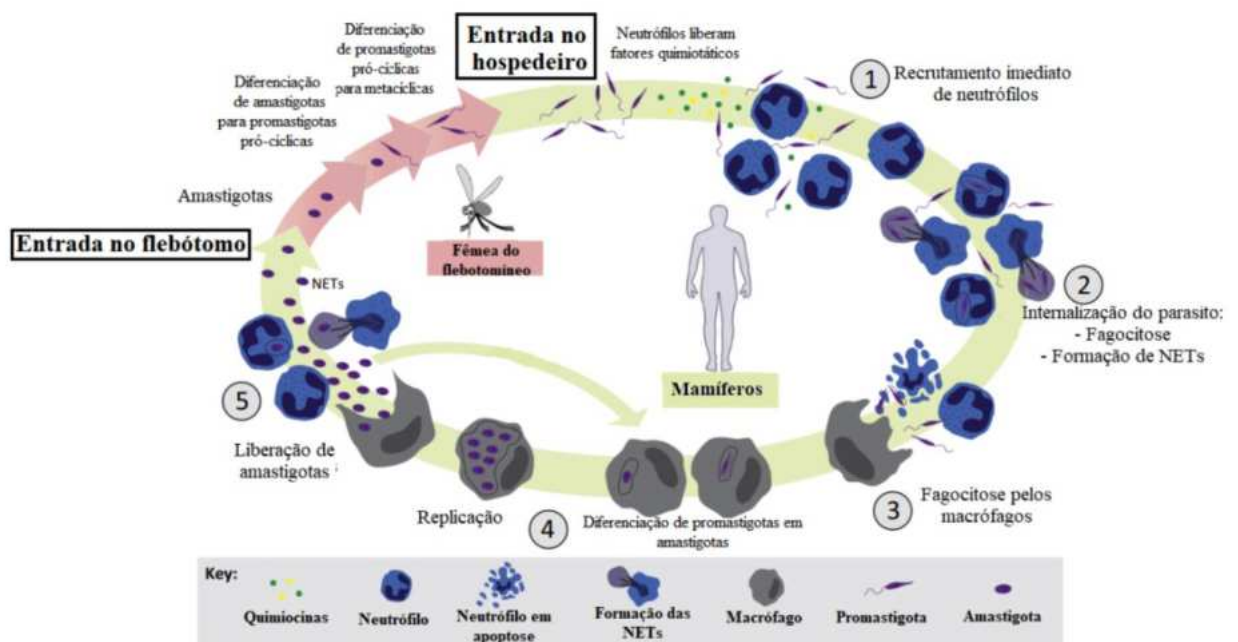


Figura 2 - O ciclo de vida de *Leishmania spp.* (Adaptado de Hurrell *et al.*, 2016)

1.4 Imunobiologia das leishmanioses

As leishmanioses são caracterizadas, principalmente, por uma resposta imune Th1/Th2, uma vez que a resposta mediada por células CD4 + Th1 é associada à resistência à patologia, através da produção de citocinas pró-inflamatórias, como: IFN- γ IL-12, IL-2, enquanto a resposta CD4 + Th2 é associada à susceptibilidade mediada pela produção de citocinas, como: IL-4, IL-13 e IL-5 (Srivastava *et al.*, 2012). No entanto, existem muitos outros fatores que podem influenciar na resistência ou suscetibilidade à doença, como: o tamanho do inóculo, a via de inoculação, a espécie do parasito e o background animal (Dunning *et al.*, 2009).

Em camundongos C57BL/6, que são reconhecidos por sua resistência a infecção por *Leishmania major*, resulta na geração de células Th1, que produzem citocinas como o IFN- γ e IL-12 capazes de combater a infecção. Já em camundongos BALB/c, que são suscetíveis à

infecção, ocorre a geração de células Th2, que produzem citocinas como a IL-4, favorecendo a progressão da infecção e impedindo a resolução da doença (Scott & Novais, 2016).

De maneira geral, é possível observar que a produção de IFN- γ por células T é fundamental para o controle da lesão e da carga parasitária em casos de infecção por *L. amazonensis* (Pinheiro e Rossi-Bergmann, 2007). No entanto, diferentemente do que é visto em modelo murino, na leishmaniose humana a produção de citocinas do perfil Th2 não está diretamente relacionada com a manutenção da doença (Christensen *et al.*, 2019), deixando em aberto a possibilidade de outras células e citocinas estarem envolvidas com o perfil de susceptibilidade ou resistência.

A partir desse momento, será dado um destaque para as respostas envolvendo IL-17, elastase, IL-22 e IL-23.

1.4.1 Eixo IL-17/elastase neutrofílica na leishmaniose

A importância da IL-17, uma citocina pró-inflamatória, produzida por células Th17, T CD8+, NKT e, principalmente, células T $\gamma\delta$ (O'BRIEN *et al.*, 2010), tem se tornado cada vez mais evidente no contexto da leishmaniose. Embora seu papel nesse contexto ainda não tenha sido completamente esclarecido, sua produção já foi associada a patogenicidade (Dos-Santos *et al.*, 2019; Lopez Kostka *et al.*, 2009). Além disso, é sabido que IL-17 é importante para o recrutamento de neutrófilos para o local do repasto sanguíneo (Tesmer *et al.*, 2008).

Os neutrófilos, por sua vez, desempenham um papel crucial no estabelecimento da infecção por *Leishmania spp.*, uma vez que são uma das primeiras células a chegarem ao local da infecção. No entanto, dependendo da espécie do parasito, os neutrófilos podem executar diferentes funções, o que pode levar à resolução ou à progressão da doença (Hurrell *et al.*, 2016). Além da fagocitose, os neutrófilos são capazes de liberar grânulos tóxicos e produzir NETs (Neutrophil Extracellular Traps), que são estruturas compostas por cromatina, histonas, elastase e grânulos contendo proteínas tóxicas que têm ação antimicrobiana (Brinkmann *et al.*, 2004). Através da produção de NETs, os neutrófilos podem causar a morte de promastigotas de *L. amazonensis in vitro* (Guimarães-Costa *et al.*, 2009). Por outro lado, durante a infecção por *L. major*, eles podem atuar como uma espécie de "cavalo de Troia", promovendo a disseminação do parasito e a progressão da doença (Laskay *et al.*, 2003). Porém, são necessários mais estudos, uma vez que a função desempenhada pelos neutrófilos depende da espécie do parasito e do modelo de estudo utilizado.

A elastase neutrofílica está presente nas NETs e na superfície de macrófagos e é uma serino peptidase. Foi observado na literatura que a elastase, que é secretada principalmente por neutrófilos, mas também por macrófagos, durante quadros de inflamação tem sua produção aumentada na presença de IL-17 (Hoshino *et al.*, 2000). Dias *et al.*, 2019 descreve que no contexto da leishmaniose visceral a ausência da elastase neutrofílica (ela2) pareceu ser benéfica, uma vez que os camundongos knockout apresentaram uma redução na carga parasitária no fígado e baço quando comparados aos camundongos do tipo selvagem. Especialmente com relação a elastase presente em macrófagos, foi observado que sua produção é importante para manutenção da produção de IFN- β , citocina importante para a sobrevivência do parasito no espaço intracelular. Além disso, a inibição de elastase pode prejudicar a ativação de células T $\gamma\delta$ induzida por neutrófilos (Towstyka *et al.*, 2018), o que pode impactar a produção de IL-17, visto que esses linfócitos são grandes fontes dessa citocina. No entanto, são necessários mais estudos, uma vez que a função desempenhada e relevância da elastase neutrofílica ainda não foi totalmente elucidada.

1.4.2 IL-23, IL-22 e IL-17 na leishmaniose

IL-22 é uma citocina pertencente à família IL-10, sendo sua produção primariamente associada às células T CD4+ (Xie *et al.*, 2000), especialmente na presença de IL-23 são produzidas por células Th17 (Chung *et al.*, 2006; McGeachy *et al.*, 2007). Além disso, pode ser produzida por células T CD8+, células Natural Killer e células T $\gamma\delta$, principalmente quando associada à presença de IL-23 (Hamada *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2009; Witte *et al.*, 2010).

A função de IL-22 tem sido fortemente associada ao reparo do dano tecidual na pele (McGee *et al.*, 2013). Como a patologia da leishmaniose cutânea envolve a destruição tecidual, há a necessidade premente de investigar seu papel nesse contexto. No modelo de infecção de leishmaniose cutânea, já foi observado um papel protetor desempenhado por essa citocina em um modelo parcialmente resistente (Gimblet *et al.*, 2015). Além disso, a produção e os níveis de IL-17 e IL-22 já foram previamente associados à proteção frente a contra a leishmaniose visceral em humanos (Pitta *et al.*, 2009).

Ademais, já foi observado que citocinas como IL-17 e IL-22 desempenham um papel relevante na proteção contra infecções por parasitos intracelulares e podem ser produzidas por células Th17 e células T $\gamma\delta$ (Nascimento *et al.*, 2015; O'Brien *et al.*, 2009).

No cenário de estudo das leishmanioses têm surgido os linfócitos T $\gamma\delta$, que até o momento não tiveram a sua função descrita no contexto da leishmaniose cutânea murina causada por *L. amazonensis*. Por se tratar de uma célula complexa, visto que que possui um perfil dicotômico, sendo um dos maiores produtores de IL-17, mas podendo também produzir IFN- γ . Dessa forma, a depender da cepa do parasito e do background animal, podem atuar de maneira diferente. Sabe-se também que a presença de IL-23 é capaz de aumentar a expressão de IL-17 em células T $\gamma\delta$ e Th17 (Sutton *et al.*, 2009). Além disso, ativa outras células produtoras de IL-17, como T CD8+ e neutrófilos (Kolls *et al.*, 2004), demonstrando, assim, um mecanismo envolvendo uma espécie de retroalimentação devido à dependência das citocinas e células envolvidas.

No contexto da leishmaniose, já foi observado em um modelo de leishmaniose cutânea em camundongos C57BL/6, que o eixo IL-23/IL-17 não interfere na resolução da lesão e nem na carga parasitária. Apesar disso, os animais IL-23^{-/-} apresentaram produção significativa de IFN- γ , indicando um perfil predominantemente Th1, enquanto os animais IL-17^{-/-} apresentaram aumento da expressão de IL-4 e IL-10, indicando um perfil mais relacionada a células regulatórias e Th2 (Dietze-Schwonberg *et al.*, 2016). Porém, em camundongos BALB/c infectados por leishmaniose cutânea, o knockout para IL-23 apresenta menor lesão e não há impacto na carga parasitária, aliado a isso, apresentam um decaimento na produção de IFN- γ (Dietze-schwonberg *et al.*, 2018).

Por outro lado, em um estudo humano, foi observado que a sinalização de IL-23 é necessária para a imunidade basal e induzida por IL-23 na produção de IFN- γ em células T $\gamma\delta$ V δ 2+ (Philippot *et al.*, 2023). Nesse sentido, faz-se necessária a compreensão do papel desempenhado por IL-23 e qual o seu impacto nas células T $\gamma\delta$ no nosso modelo.

1.6 As células T $\gamma\delta$ (Gama-delta)

As células T $\gamma\delta$ constituem uma subpopulação de linfócitos semelhante aos linfócitos T CD4+ e T CD8+, embora possuam um receptor de antígeno único composto por cadeias γ e δ , em contraste com os linfócitos T convencionais que expressam receptores de antígeno α e β (Chien *et al.*, 1987; Marrack *et al.*, 1987). Seu processo de desenvolvimento ocorre no timo, originando-se de um progenitor comum aos outros tipos de linfócitos (Dudley *et al.*, 1995; Pennington *et al.*, 2005). Esse processo tem início ainda no período fetal e ocorre em estágios

sucessivos, gerando diferentes subtipos com funções e localizações distintas (Chien *et al.*, 2014; Vantourout *et al.*, 2013).

Em camundongos, os principais subtipos de linfócitos T $\gamma\delta$ estão associados à produção de IFN- γ e/ou IL-17. Os subtipos $V\gamma1^+$, $V\gamma5^+$ e $V\gamma7^+$ estão relacionados à produção de IFN- γ , enquanto os subtipos $V\gamma4^+$ e $V\gamma6^+$ estão associados à produção de IL-17 (Ribot *et al.*, 2021). Embora representem uma minoria dos linfócitos T circulantes e nos órgãos linfóides secundários, eles podem ser mais abundantes em tecidos periféricos, como pulmões, intestino e derme (Bonneville *et al.*, 2010; Ribot *et al.*, 2021).

As células T epidérmicas dendríticas (DETC), por sua vez, são células especializadas encontradas na pele de camundongos. São células T $\gamma\delta$ que expressam TCRs idênticos, compostos por cadeias de TCR contendo $V\gamma5$ e $V\delta1$ (Bergstresser *et al.*, 1985; O'Brien *et al.*, 2015). Essas células desempenham funções cruciais no sistema imunológico, incluindo a vigilância contra tumores (Girardi *et al.*, 2001), a manutenção da homeostase da pele (Sharp *et al.*, 2005) e o processo de cicatrização (Jameson *et al.*, 2002; Toulon *et al.*, 2009). O que reforça a necessidade de estudo dessas células no contexto de uma doença como a leishmaniose cutânea, que acomete, principalmente, a pele.

Diferentemente dos linfócitos $\alpha\beta$ (T CD4⁺ e T CD8⁺), as células T $\gamma\delta$ são capazes de reconhecer uma ampla variedade de antígenos. Uma vez que podem reconhecer proteínas solúveis de vírus e bactérias, independentemente da apresentação via MHC, isso permite o reconhecimento de glicolipídeos e outros metabólitos por meio da apresentação via CD1 e MR1 (“MHC Class I-related protein”) (Vidović *et al.*, 1989; Vantourout *et al.*, 2013; Van Rhijn *et al.*, 2015). Além disso, podem reconhecer fosfoantígenos por meio da apresentação via butirofilina 2A1 e 3A1 (BTN2A1 e BTN3A1) (Rigau *et al.*, 2020). Além de CD1d, também, expressam outros receptores importantes, como NK1.1, PD-1 (Silva-Santos *et al.*, 2019; Papotto *et al.*, 2017; Chien *et al.*, 2014), além dos receptores Toll-Like e Natural Killer (NKG2D e NKG2C), que estão envolvidos no reconhecimento de PAMPs (Lawand *et al.*, 2017). Além disso, podem atuar de forma citotóxica, secretando grânulos que levam à liberação de granzima (uma protease pró-apoptótica) e perforina (uma molécula que forma poros na célula) (Todaro *et al.*, 2009). Sua capacidade de reconhecimento independente de antígenos e a expressão de receptores importantes para a imunidade inata tornam essas células fundamentais na integração das respostas imunes inata e adaptativa.

Embora estejam em menor número em comparação com outros linfócitos, as células T $\gamma\delta$ podem se expandir nos linfonodos drenantes do local da infecção e no baço em resposta a infecções (Dos-Santos *et al.*, 2019; Deroost *et al.*, 2018). Em outras doenças parasitárias,

como as infecções por *Plasmodium spp.*, a expansão de linfócitos T $\gamma\delta$ em pacientes e modelos experimentais também demonstrou ter um papel protetor, possivelmente mediado pela produção de citocinas e pela capacidade citotóxica desses linfócitos, levando à morte direta ou à liberação de grânulos na presença de merozoítas (Costa *et al.*, 2011; Deroost *et al.*, 2018). Além disso, camundongos com linfócitos T $\gamma\delta$ depletados não são capazes de resolver a infecção por *Plasmodium berghei*, corroborando a hipótese de que essas células desempenham um papel importante na proteção contra a doença (Kobayashi *et al.*, 2007). Observou-se também que essas células são capazes de suprimir a infecção por *Plasmodium falciparum*, por meio da fagocitose e da liberação de granzima B, uma protease pró-apoptótica (Junqueira *et al.*, 2021).

Conforme observado na literatura, essas células têm sido fortemente associadas a um papel protetor contra doenças infecciosas. Além disso, têm sido objeto de estudo no contexto da imunoterapia contra o câncer, em grande parte devido à sua capacidade de reconhecer diversos antígenos e atuar seletivamente contra células cancerígenas (Deng *et al.*, 2022).

A atividade das células T $\gamma\delta$ pode ser modulada por diversas células, moléculas e citocinas. Como, por exemplo, através da secreção de elastase neutrofílica, que tem sido identificada como um fator de influência, uma vez que a inibição dessas serino peptidases impede a ativação das células T $\gamma\delta$ induzida por neutrófilos (Towstyka *et al.*, 2018). Além disso, foi relatado que durante infecções por *E. coli*, a produção de IL-17 por células T $\gamma\delta$ desempenha um papel importante no controle do infiltrado de neutrófilos, como evidenciado pela redução do infiltrado quando o IL-17 é neutralizado (Shibata *et al.*, 2007).

Dada a capacidade das células T $\gamma\delta$ de produzir citocinas de forma dual, como IFN- γ e IL-17, seu papel assume relevância em diferentes infecções. Nesse contexto, estudos na literatura destacam a importância das células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ , seja no contexto viral (Khairallah; Déchanet-Merville; Capone, 2017) ou parasitário (Pamplona; Silva-Santos, B. 2021). Por outro lado, as células produtoras de IL-17 desempenham um papel protetor contra infecções fúngicas (Conti *et al.*, 2014) e bacterianas, como em casos envolvendo *Staphylococcus* (Papotto; Ribot; Silva-Santos, 2017).

É sabido que as células T $\gamma\delta$ têm a capacidade inata de produzir IL-17 na presença de IL-23 (Sutton *et al.*, 2009). E, especialmente em estados inflamatórios, é comum observar uma expressão elevada de IL-23R por parte das células T $\gamma\delta$ (Malik; Want; Awasthi, 2016). O que pode estar associado à estimulação da produção de IL-17 por essas células (Riol-Blanco *et al.*, 2010).

Visto isso, é possível perceber que esses linfócitos desempenham um papel fundamental na defesa do organismo contra agentes invasores, e a função a ser desempenhada por eles está intimamente ligada ao perfil de produção de citocinas. Dessa forma, torna-se necessário estudar o papel imunológico dessas células em diferentes contextos de produção de citocinas.

1.7 As células T $\gamma\delta$ e a leishmaniose cutânea experimental

Conforme mencionado anteriormente, as células T $\gamma\delta$ possuem um perfil dicotômico, uma vez que podem estar associadas à produção de IL-17 ou IFN- γ . No contexto da infecção por *Leishmania spp*, a produção de diferentes citocinas pode resultar em diferentes perfis de carga parasitária e lesões. Visto que, na literatura, a produção de IFN- γ é frequentemente associado à proteção contra a infecção por *L. amazonensis*, enquanto a produção de IL-17 está frequentemente relacionada ao agravamento da leishmaniose cutânea (Pinheiro *et al.*, 2007; Lopez Kostka, 2009). Entretanto, o modelo animal também influencia no papel desempenhado por essa célula.

Dessa forma, ainda não há um consenso na literatura quanto ao papel desempenhado por essas células. Já que no contexto da infecção por *L. major*, camundongos C57BL/6 parcialmente resistentes têm nas células T $\gamma\delta$ a principal fonte de IL-17 (Dietze-Schwonberg *et al.*, 2019). Por outro lado, em camundongos BALB/c suscetíveis as células T CD4+ são a principal fonte de IL-17, havendo uma maior produção em comparação ao C57BL/6. Além disso, camundongos BALB/c knockout para IL-17 demonstraram resistência parcial à infecção, reforçando a hipótese de que IL-17 pode estar relacionada à progressão da doença nesse modelo (Lopez Kostka *et al.*, 2009). Entretanto, em outros modelos de infecções por parasitos intracelulares, já foi observado que citocinas como IL-17 e IL-22 desempenham um papel relevante na proteção e podem ser produzidas por células Th17 e T $\gamma\delta$ (Nascimento *et al.*, 2015; O'Brien *et al.*, 2009).

Apesar de estudos na literatura terem demonstrado que, em modelos de infecção por leishmaniose cutânea, em camundongos C57BL/6 parcialmente resistentes, as células T $\gamma\delta$ não atuam no controle do desenvolvimento da lesão e da carga parasitária (Satoskar *et al.*, 1997; Hartley *et al.*, 2016). Por outro lado, em modelos de infecção por *L. major* (LV39) e *L. amazonensis* (Josefa) em camundongos BALB/c suscetíveis, observou-se que o bloqueio da sinalização do receptor TCR $\gamma\delta$ resulta em uma lesão e carga parasitária maiores em camundongos infectados (Rosat *et al.*, 1993; Pinto *et al.*, 2003). Demonstrando que, no modelo suscetível, essas células são importantes para a proteção.

Ademais, em um modelo de vacinação oral com antígenos de *L. amazonensis*, o papel protetor da imunização em animais BALB/c foi revertido quando os linfócitos T $\gamma\delta$ foram depletados, indicando a possibilidade de que essas células sejam importantes para o mecanismo de proteção da vacina (Pinto *et al.*, 2003). No entanto, ainda não há um consenso na literatura sobre a função desempenhada por esses linfócitos no contexto da leishmaniose cutânea murina, uma vez que pode depender da cepa do parasito e do background animal. Dessa forma, o estudo da função dessas células é essencial para o melhor entendimento da resposta imune mediada por células T $\gamma\delta$ frente à infecção por *Leishmania spp.*, o que pode ter um impacto significativo no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas eficazes contra doenças infecciosas.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas (DTNs), devido a isso, há uma escassez de estudos sobre a doença que busquem compreender a imunologia da infecção em busca de melhores abordagens terapêuticas. Uma vez que as terapias disponíveis atualmente não são satisfatórias, visto que possuem uma alta toxicidade e não há uma vacina para humanos disponível ainda. Nesse sentido, faz-se necessário o estudo de diferentes cenários imunológicos, na busca da compreensão dos mecanismos envolvidos na patologia da doença onde poderíamos interferir a fim de desenvolver terapias alternativas e/ou uma vacina.

Anteriormente, o nosso grupo observou que em camundongos Sv129 suscetíveis a *L. amazonensis* há uma expansão de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 nos linfonodos drenantes durante a infecção por *L. amazonensis* (Dos-Santos *et al.*, 2019). Além disso, foi observado que a presença de IL-17 e células T $\gamma\delta$ estão associadas a lesões de pacientes infectados por *Leishmania amazonensis* e outras espécies (Darabi *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2021). Para dar prosseguimento ao estudo da avaliação do impacto das células T $\gamma\delta$ em modelo experimental, nós realizamos a migração do modelo suscetível (Sv129) para o modelo parcialmente resistente (C57BL/6), devido à maior disponibilidade de camundongos knockouts e repórter nesse background.

Os linfócitos T $\gamma\delta$ ainda não tiveram a sua função descrita no contexto da leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6 totalmente elucidada. Devido a sua dicotomia, apesar de serem um dos maiores produtores de IL-17, também possuem a capacidade de produzir IFN- γ , a depender da cepa do parasito e do background animal, podendo atuar de maneira diferente e resultar em um desfecho diferente da doença.

Nesse sentido, existem citocinas e moléculas que constituem importantes sinalizações intermediárias para que essa célula desempenhe as suas funções, portanto a avaliação das mesmas precisa ser explorada em diferentes contextos imunológicos, e, para isso, empregaremos o uso de camundongos knockouts de elastase neutrofílica, IL-22 e IL-23.

3. OBJETIVO

O projeto tem como objetivo geral avaliar o papel das células T gama delta ($\gamma\delta$) no contexto da infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos C57BL/6 knockout (KO) para células T $\gamma\delta$, IL-23, IL-22 e elastase neutrofílica, durante a fase de pico e crônica.

3.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a lesão e carga parasitária em camundongos C57BL/6 WT e knockouts infectados com *L. amazonensis*;
2. Avaliar a expansão de células T $\gamma\delta$ em linfonodos drenantes de camundongos C57BL/6 WT e knockouts infectados com *L. amazonensis*;
3. Avaliar a indução de produção IL-17 por células T $\gamma\delta$ em camundongos C57BL/6 WT e knockouts infectados com *L. amazonensis*;
4. Avaliar a produção de IL-17 e IFN- γ por camundongos C57BL/6 WT e knockouts infectados com *L. amazonensis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram obtidos do Biotério Central do CCS. Foram utilizados knockouts para IL-23, IL-22, elastase e TCR delta que foram obtidos do Biotério Geral da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Os animais foram mantidos em gaiolas com cama de maravalha e receberam água filtrada e alimento comercial Nuvilab. Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do CCS da UFRJ, sob o protocolo CEUA: (A07-21-037-20)

4.2 Parasito

Os parasitos foram isolados a partir das lesões de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* cepa MHOM/BR/75/Josefa conforme descrito no tópico 4.5. Foram mantidos como promastigotas em meio de cultura M199 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e hemina (400 μ g/200ml) incubado a 26°C.

4.3 Infecção e paquimetria

4.3.1 Lavagem e contagem da *Leishmania amazonensis*

Para realizar a infecção é necessário realizar a lavagem da cultura do parasito que será utilizado e a contagem do inóculo. Em fluxo laminar, a garrafa contendo a cultura de *Leishmania* em fase estacionária foi vertida em um falcon de 50 mL. Em seguida, o falcon foi avolumado com PBS estéril até completar os 50 mL e centrifugado a 1000 x G por 10 minutos. Seguido da primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1ml de PBS, o falcon foi avolumado novamente para 50ml e foi centrifugado. Após essa etapa, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado com PBS e avolumado para 1 mL no falcon. Foram retirados 10 µL do falcon e adicionados em uma solução (1) de paraformaldeído 1% contendo 990 µL, depois de homogeneizado, foram retirados 10 µL dessa solução e transferidas para uma solução (2) de paraformaldeído 1% contendo 90 µL, para contagem. O falcon foi avolumado novamente para o seu total e centrifugado novamente, enquanto a solução com paraformaldeído foi contada em microscópio utilizando uma câmara de Neubauer, onde os 25 quadrantes centrais foram contados. Após a terceira lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado novamente com PBS, totalizando 1 mL. Foram retirados 100 µL do falcon e transferidos para um eppendorf, que foi avolumado para 1 mL com PBS estéril, totalizando uma solução com concentração final de 1×10^8 , onde a cada 20 µL teremos a concentração desejada do inóculo e 2×10^6 .

4.3.2 Infecção e acompanhamento da lesão

Os animais utilizados foram infectados no coxim plantar da pata traseira direita, com o auxílio de uma seringa (HAMILTON) com 2×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) em um volume de 20 µL de phosphate-buffered saline (PBS). O acompanhamento da lesão durante todo o experimento foi realizado com um paquímetro Mitutoyo. O tamanho das patas também foi medido previamente à infecção, de modo que, o avanço da lesão será calculado a partir da diferença entre o tamanho da pata infectada e o tamanho antes da infecção.

4.4 Ensaio de Diluição Limitante (LDA)

O LDA foi realizado para determinar a carga parasitária presente nos órgãos dos animais previamente infectados. Para isso, os linfonodos e patas foram removidos cirurgicamente, as patas foram colocadas em álcool 70% para desinfecção por 1 minuto. Em seguida, todos os órgãos foram pesados e macerados com 1 mL de meio M199 (patas) e 1 mL de RPMI (linfonodos) em fluxo laminar. Posteriormente a isso, 50 µL do macerado obtido de cada um dos animais foi transferido para uma placa de 96 poços.

Em uma placa de 96 poços, 150 μ L de meio de cultura M199, suplementado com 10% de SFB e hemina (400 μ g/200ml), foi adicionado em cada um dos poços. No primeiro poço, 50 μ L da amostra foram adicionados e, em seguida, uma diluição de 1:4 foi realizada, transferindo 50 μ L da diluição para o poço seguinte, resultando em um total de 24 diluições por amostra. Por fim, as placas foram colocadas em uma incubadora de demanda de bio-oxigênio (BOD) a 26°C por 7 a 14 dias. Passado esse tempo, o último poço a mostrar crescimento de promastigotas, observado em microscópio de luz, foi marcado e utilizado para calcular o número total de parasitas presentes no órgão. O cálculo utilizado foi o seguinte:

Número de parasitas = $4x /$ (massa de órgãos em gramas); onde x é o número da diluição do último poço no qual os parasitas foram observados.

4.5 Citometria de fluxo

Após a eutanásia dos animais, os linfonodos drenantes foram coletados e processados conforme descrito anteriormente, e a quantificação celular foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer em microscópio de luz, utilizando azul de tripam. Após a contagem, 1×10^6 células foram plaqueadas em uma placa de 96 poços. A coloração de marcadores intracelulares e extracelulares foi realizada de acordo com as instruções de cada fabricante. As células foram reestimuladas *ex vivo* ao longo de 4 horas com 13-acetato de 12-miristato de forbol (PMA; 20ng/mL) e ionomicina (1 μ g/mL) na presença de um inibidor do complexo de Golgi (brefeldina A) para análise de citocina intracelular. Os marcadores extracelulares foram corados por 30 minutos, e as células foram fixadas e permeabilizadas para permitir a coloração intracelular por 60 minutos. Células de linfonodos de camundongos infectados e controles foram fenotipadas de acordo com os critérios descritos por Cossarizza *et al.* (2017). Os anticorpos utilizados neste trabalho foram: anti-CD3 (BV421, BioLgend, San Diego, CA, USA - 1:200), anti-CD4 (APC-CY-7, BioLgend, San Diego, CA, USA - 1:200), anti-TCR $\gamma\delta$ (BV510, BioLgend, San Diego, CA, USA - 1:200) e anti-CD8 (PERCP-CY-5.5, BioLgend, San Diego, CA, USA - 1:200) para os marcadores extracelulares, anti-IL-17 (APC, BioLgend, San Diego, CA, USA - 1:100) e anti-IFN- γ (PE, BioLgend, San Diego, CA, USA - 1:200) para os marcadores intracelulares. A análise foi realizada no software FlowJo.

5. RESULTADOS

5.1 Células T $\gamma\delta$ e Elastase Neutrofílica agravam a lesão em camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis* na fase de pico da infecção.

A fim de avaliar o papel das sinalizações intermediárias envolvidas na função desempenhada pelas células T $\gamma\delta$, animais knockout para IL-23, elastase, TCR δ , e C57BL/6 WT como controle, foram infectados com um inóculo de 2×10^6 de *L. amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) pela via subcutânea. Foi observado que até 40 dias após a infecção

todos os animais apresentam perfil de lesão semelhante (Figura 3a). No entanto, os animais TCR $\delta^{-/-}$ e Elastase $^{-/-}$ apresentam controle da lesão na fase de pico da infecção, entre 40 e 60 dias após a infecção, porém os animais WT e IL-23 $^{-/-}$ apresentam aumento no tamanho da lesão em comparação com os camundongos TCR $\delta^{-/-}$ e Elastase $^{-/-}$ de modo que na fase de pico suas lesões são similares (Figura 3a). Além disso, é importante observar que os animais IL-23 $^{-/-}$ na fase crônica apresentam o aumento contínuo da lesão enquanto os animais WT tem sua lesão controlada (Figura 3a), demonstrando assim a possibilidade de envolvimento de IL-23 no processo de controle da lesão na fase crônica. Para quantificação da carga parasitária foi realizado o LDA a partir do sítio de infecção e linfonodos drenantes. Apesar da diferença significativa no tamanho das lesões entre os animais C57BL/6 WT, TCR delta $^{-/-}$, IL-23 $^{-/-}$ e elastase $^{-/-}$ durante o pico da infecção, na fase crônica os seus perfis de lesão são similares. Isso pode ter influenciado para que não fosse observado diferença em relação a carga parasitária presente na pata (Figura 3b) e no linfonodo drenante da lesão (Figura 3c), já que a eutanásia foi realizada nesse momento.

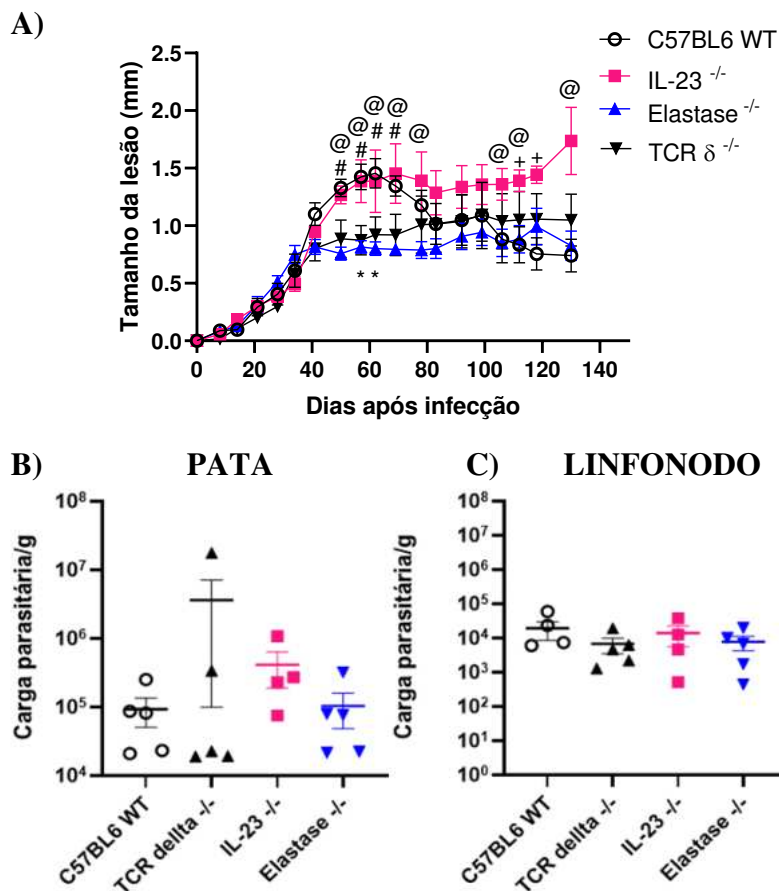


Figura 3 - A ausência das células T $\gamma\delta$ e elastase podem estar associados a melhora do perfil de lesão no pico da infecção. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As lesões foram acompanhadas semanalmente com o auxílio de um paquímetro ao longo de 140 dias após infecção (A). Ao final do experimento foi realizado o ensaio de diluição limitante (LDA) a partir do principal sítio de infecção (patas) e dos linfonodos poplíteos drenantes, com base nisso foi possível avaliar a carga parasitária por grama de tecido dos camundongos C57BL/6 WT, TCR delta $^{-/-}$, IL-23 $^{-/-}$ e elastase $^{-/-}$, na pata

(B) e linfonodos drenantes (C) que apresentaram um perfil similar de carga parasitária em ambos os tecidos. (média SEM; n = 4-5). * diferença estatística entre C57BL/6 WT e TCR $\delta^{-/-}$; # diferença estatística entre C57BL/6 WT e Elastase $^{-/-}$; + diferença estatística entre C57BL/6 WT e IL-23 $^{-/-}$; @ diferença estatística entre IL-23 $^{-/-}$ e Elastase $^{-/-}$; obtido a partir da análise Two-way ANOVA utilizando o pós-teste de Bonferroni.

5.2 Os animais infectados por *Leishmania amazonensis* apresentaram maior celularidade nos linfonodos drenantes da lesão

Com o objetivo de avaliar a resposta imune e o papel das sinalizações intermediárias envolvidas na função desempenhada pelas células T $\gamma\delta$, animais knockout para IL-23, elastase, TCR δ , e C57BL/6 como controle, foram infectados com um inóculo de 2×10^6 de *L. amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa). Os linfonodos drenantes dos animais infectados foram coletados, macerados e contados, para posterior análise em citometria de fluxo. Os animais infectados apresentaram maior celularidade, em comparação com os animais naïves (Figura 4a). Especialmente os animais deficientes de IL-23 infectados, apresentaram maior celularidade em comparação com os animais TCR δ e elastase $^{-/-}$, que apresentaram menor lesão (Figura 4a).

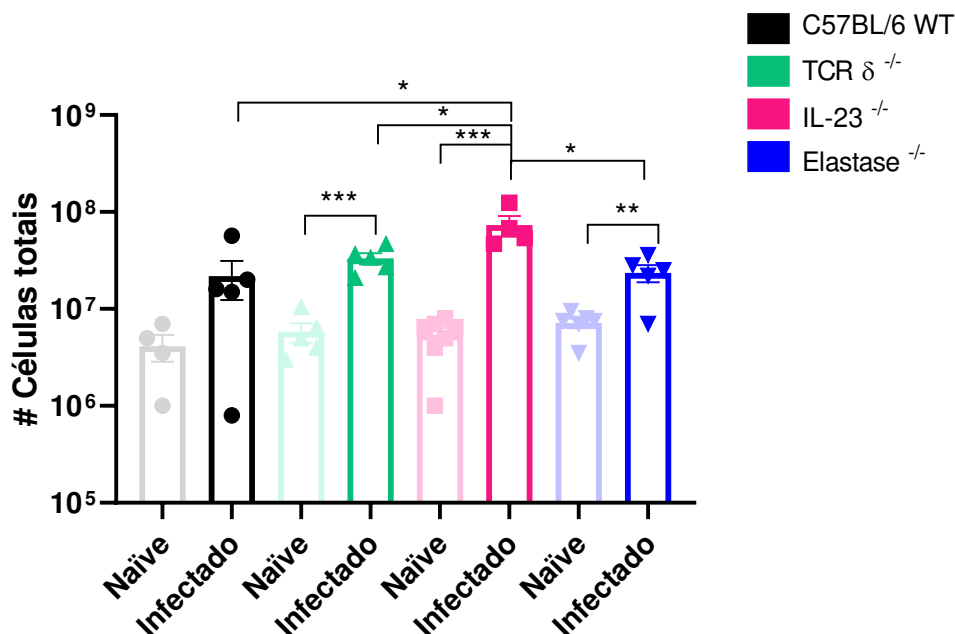


Figura 4 - Celularidade do linfonodo drenante dos animais C57BL/6 WT, TCR delta $^{-/-}$, IL-23 $^{-/-}$ e elastase $^{-/-}$ Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. Ao final do experimento foi realizada a contagem de linfócitos a partir dos linfonodos poplíteos drenantes das lesões dos camundongos C57BL/6 WT, TCR delta $^{-/-}$, IL-23 $^{-/-}$ e elastase $^{-/-}$ infectados e não infectados (naïves) usando a câmara de Neubauer. (média \pm SEM σ ; n = 4-5) * P < 0,5; **P < 0,01; ***P < 0,001, obtido do teste t de Student.

Ao avaliarmos as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, foi observado que os animais elastase $^{-/-}$ -infectados apresentaram redução na frequência de células T CD4⁺ (Figura 5a), porém, esse padrão não se repete com relação ao número (Figura 5b). Apesar de não haver alteração na frequência, os animais IL-23 e TCR $\delta^{-/-}$ infectados apresentam maior número de linfócitos T CD4⁺ em comparação aos seus respectivos camundongos naïves

controle (Figura 5a, b). Destacando-se os animais IL-23^{-/-} que superaram em número, os animais deficientes de células T $\gamma\delta$ e elastase infectados (Figura 5b). Os animais TCR δ e IL-23^{-/-} infectados apresentaram maior número e frequência de células T CD8⁺, em comparação com seus respectivos camundongos naíves controle (Figura 5c, d). Além disso, os animais infectados IL-23^{-/-} apresentaram maior número de células T CD8⁺, se comparados aos animais deficientes de células T $\gamma\delta$ e elastase infectados (Figura 5c). Enquanto os animais elastase^{-/-} infectados não apresentaram aumento em número e frequência de células T CD8⁺ (Figura 5c, d).

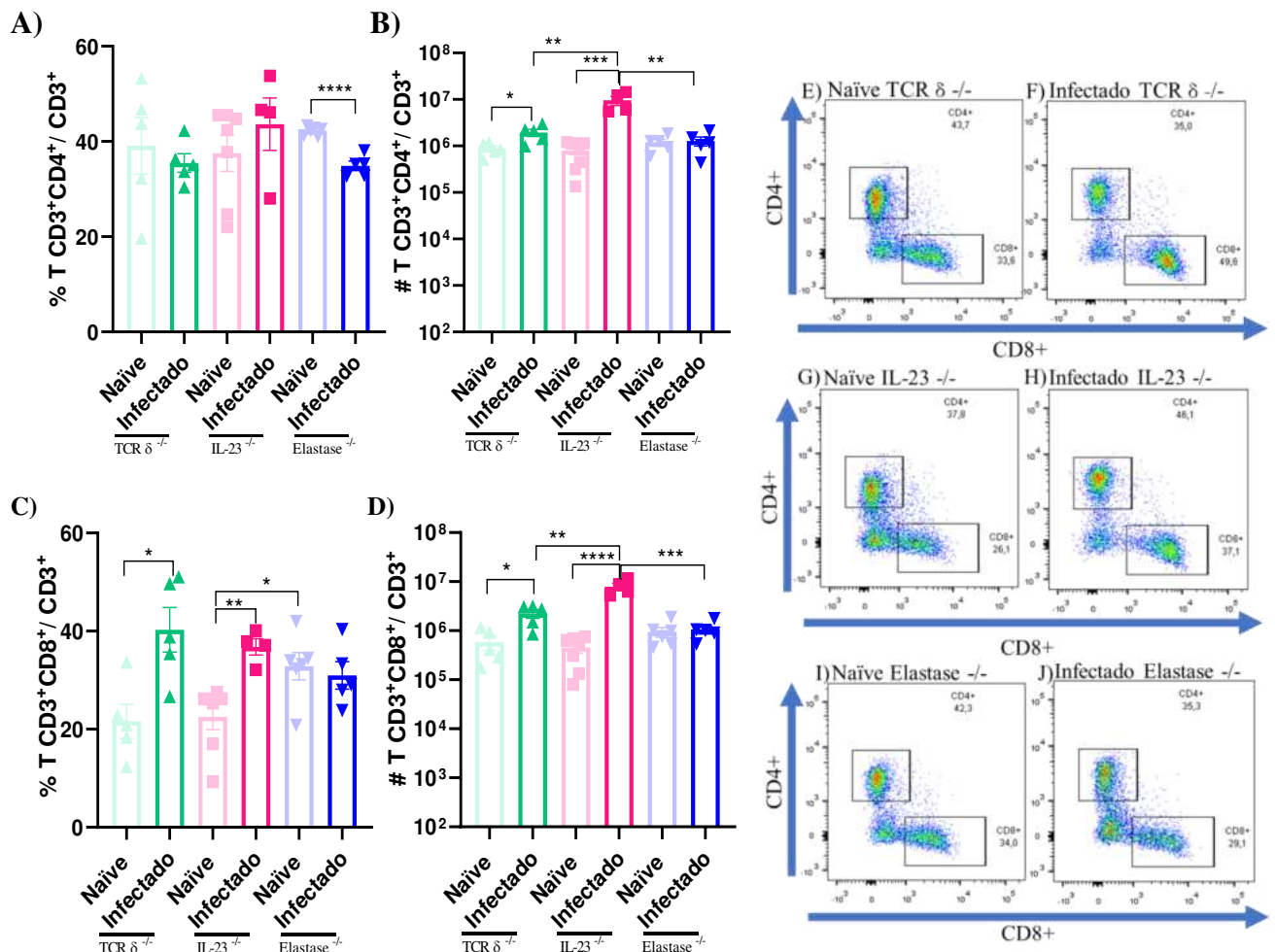


Figura 5 - Análise da frequência e número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. Os linfonodos dos camundongos, TCR delta^{-/-}, IL-23^{-/-} e Elastase^{-/-} infectados e não infectados (naíves) foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e coradas para citometria de fluxo; frequência (A) e número total (B) de células T CD4⁺, frequência (C) e número total (D) de células T CD8⁺ e dot plot representativo (G, E, I) para animais naíves e (H, F, J) para animais infectados. (média \pm SEM; n = 4-5) * P < 0,5; **P < 0,01; ***P < 0,001, obtido do teste t de Student.

5.3 Os animais Elastase^{-/-} infectados por *L. amazonensis* exibiram uma diminuição na frequência de células T $\gamma\delta$ totais

Em seguida, determinamos a indução de células T $\gamma\delta$ em animais IL-23, elastase^{-/-} e C57BL/6 e WT. Foi observado que os animais IL-23 e elastase^{-/-} infectados apresentam

menor frequência de células T $\gamma\delta$ (Figura 6a), no entanto, em relação ao número há um aumento nos camundongos IL-23^{-/-} infectados (Figura 6b), o que pode estar relacionado ao aumento de células no linfonodo (Figura 4a), visto que esses animais apresentaram a maior lesão em estágios mais tardios da infecção (Figura 3a). Com relação ao perfil imunológico, os animais elastase^{-/-} apresentaram diminuição de número de células T $\gamma\delta$ totais em comparação com os seus respectivos animais naïve controle (6b). Além disso, os animais IL-23^{-/-} infectados, apresentaram maior número de células em comparação ao grupo naïve controle (6b).

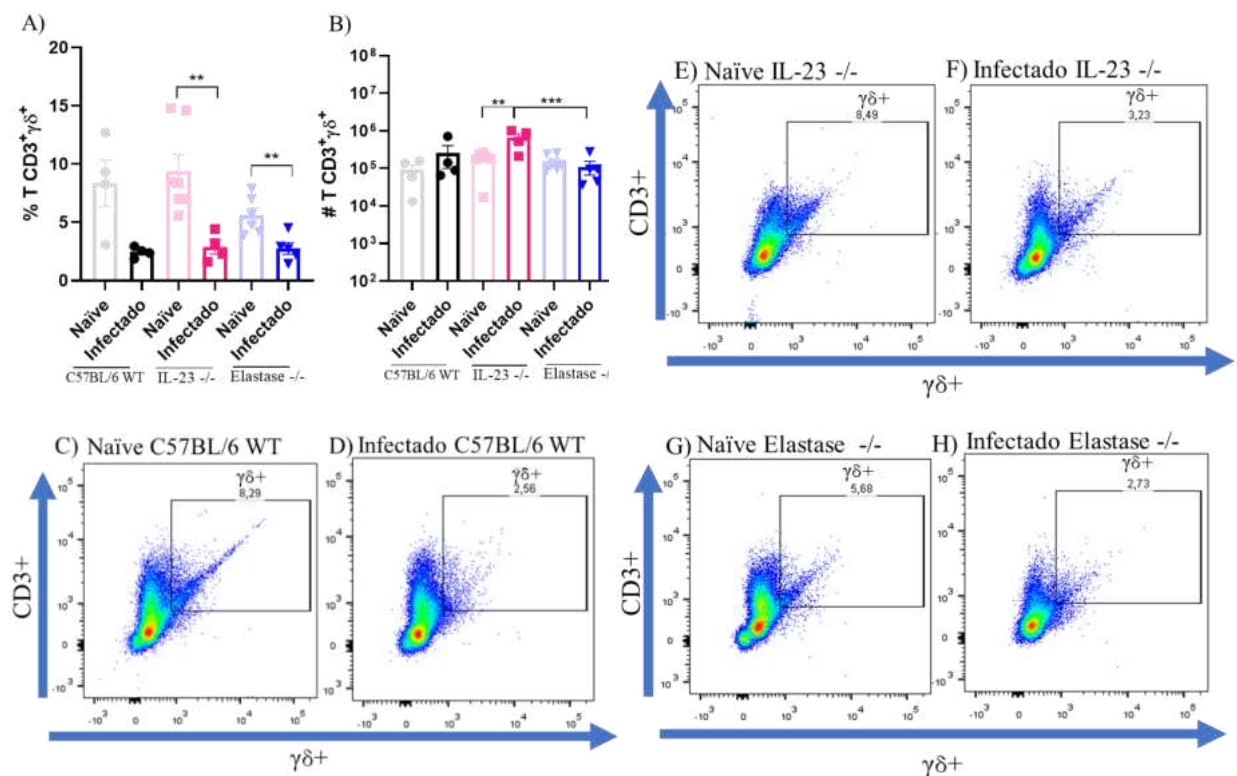


Figura 6- A infecção por *L. amazonensis* reduz a frequência e número de células T $\gamma\delta$ em animais elastase^{-/-}. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos C57BL/6 WT, IL-23^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naïves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e coradas para citometria de fluxo; frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁺ e dot plot representativo (C, E, G) para animais naïves e (D, F, H,) para animais infectados. (média \pm SEM σ ; n = 4-5) * P < 0,5; **P < 0,01; ***P < 0,001, obtido do teste t de Student.

5.4 Os animais IL-23^{-/-} infectados por *L. amazonensis* apresentam expansão de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17A

Com relação a produção de IL-17A por células T $\gamma\delta$, os animais IL-23^{-/-} infectados por *L. amazonensis* tiveram seu número e frequência aumentados em comparação aos controles naïves (Figura 7a, b). Enquanto os animais Elastase^{-/-} infectados exibiram frequência e número (7a, b) similares aos animais WT. Aliado a isso, não apresentaram diferença se comparados com o seu grupo naïve controle (Figura 7a,b), indicando que a ausência de elastase pode impactar na indução desse tipo celular. Por outro lado, os animais IL-23^{-/-}

infectados superaram o número e frequência de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17A em animais WT e Elastase^{-/-} infectados (Figura 7a, b). Indicando, que não só a produção de IL-17A é independente na presença de IL-23, como também, que sua ausência pode induzir o aumento desse tipo celular. É interessante mencionar que o grupo elastase apresentava a menor lesão ao longo de toda a infecção, enquanto o grupo IL-23^{-/-} sofreu um aumento de lesão em fases mais tardias da infecção, o que pode estar relacionado com esse aumento.

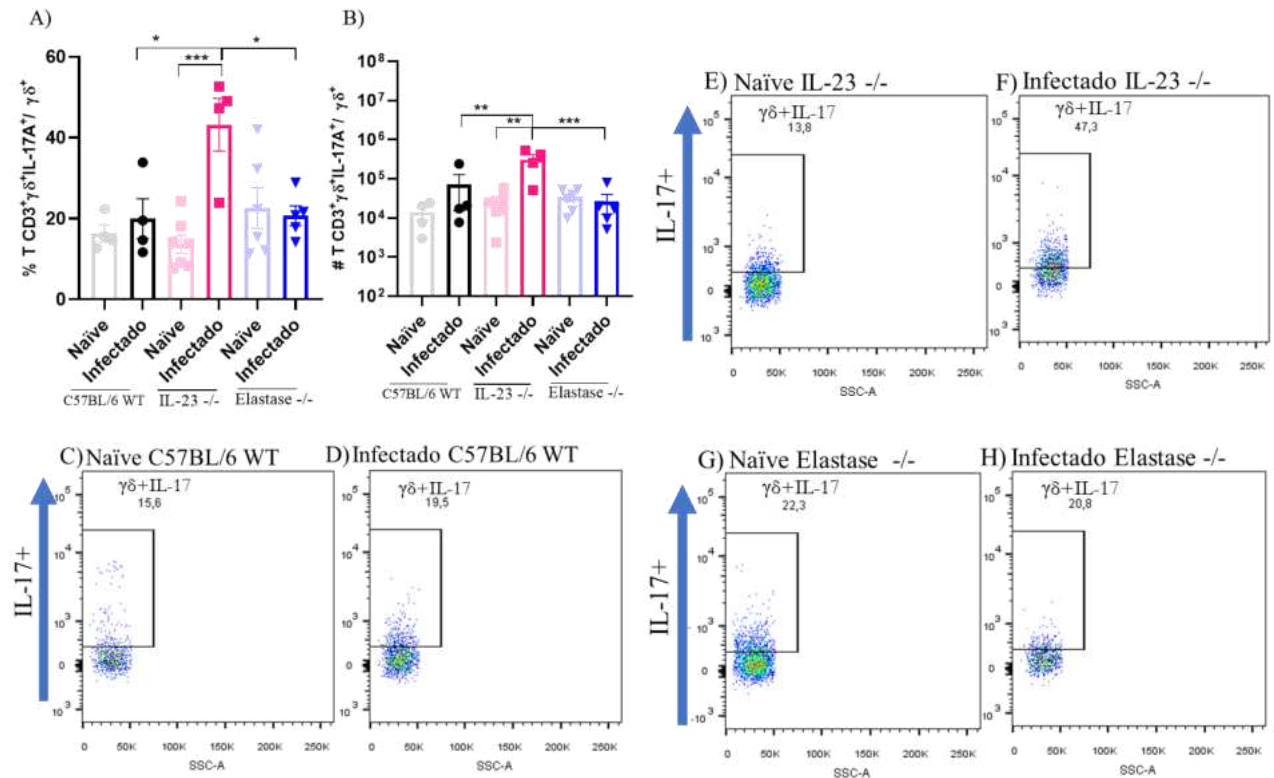


Figura 7 - As células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17A são expandidas em camundongos IL-23^{-/-} infectados por *L. amazonensis*. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos C57BL/6 WT, IL-23^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naïves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁺IL-17A⁺ $\gamma\delta$ ⁺ e dot plot representativo (C, E, G) para animais naïves e (D, F, H) para animais infectados. (média \pm SEM σ ; n = 4-5) * P < 0,5; **P < 0,01; ****P < 0,0001 obtido do teste t de Student.

5.5 Os animais IL-23^{-/-} infectados por *L. amazonensis* exibiram expansão de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ

Tratando-se da população de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ , foi observado que os animais IL-23^{-/-} infectados por *L. amazonensis* apresentaram maior frequência e número, quando comparados com os seus respectivos animais naïve controle e animais WT e elastase^{-/-} infectados (Figura 8a). É possível observar que os animais elastase^{-/-} e WT infectados não apresentaram diferença com relação aos seus respectivos animais naïve controle (Figura 8a, b). Indicando que o contexto de infecção parece não afetar a indução de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ em camundongos WT.

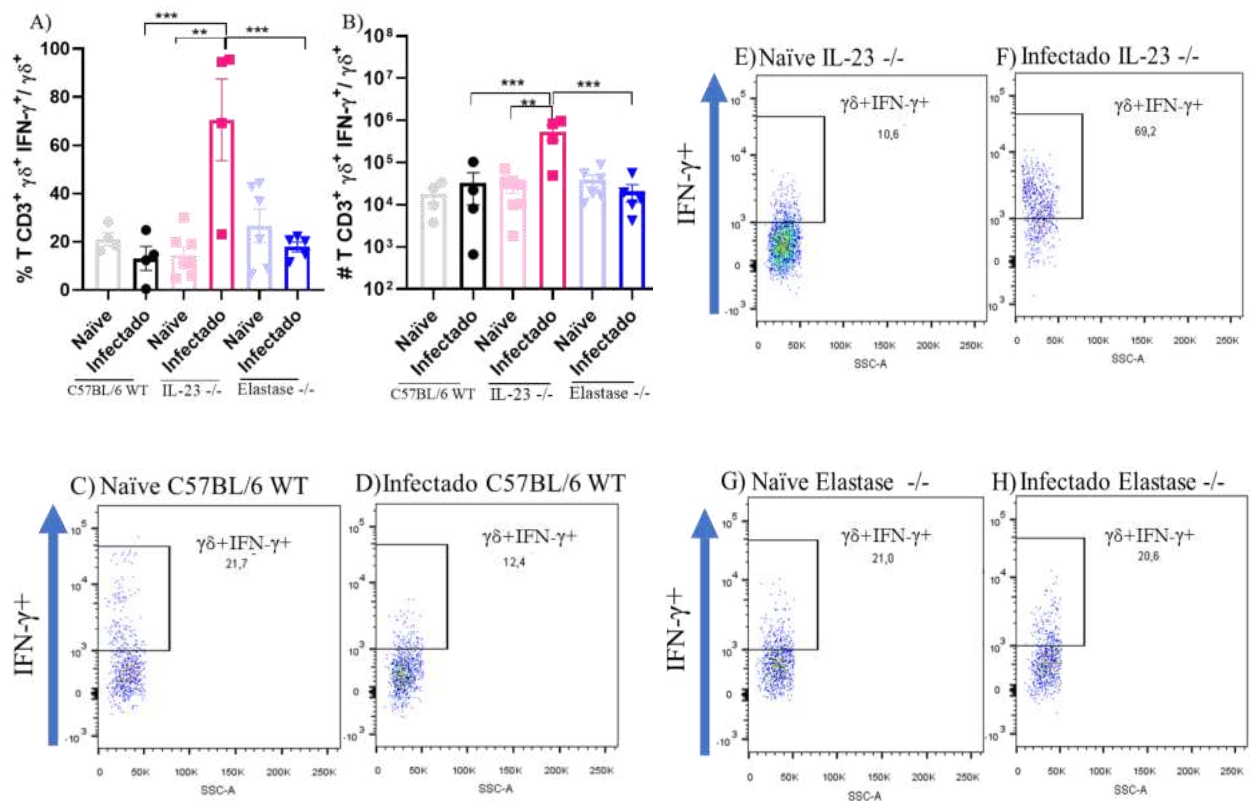


Figura 8 - As células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ são expandidas em camundongos IL-23^{-/-} infectados por *L. amazonensis*. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos TCR delta^{-/-}, IL-23^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naïves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺γδ⁺IFN-γ⁺/γδ⁺ e dot plot representativo (C, E, G) para animais naïves e (D, F, H) para animais infectados. (média ± SEM; n = 4-5) **P <0,01; ***P <0,001, obtido do teste t de Student.

5.6 Os animais IL-23^{-/-} infectados apresentaram maior número de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A

Com relação as células T CD4⁺ produtoras de IL-17A, não foi observada diferença na frequência em nenhum dos animais infectados e/ou não infectados (Figura 9a). Porém, o número dessas células foi aumento em animais IL-23^{-/-} infectados, se comparados aos animais infectados TCR δ e Elastase^{-/-} (Figura 9b). Além de ter apresentado maior número de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A, se comparados com os animais não infectados (Figura 9b). É importante ter em mente que o grupo IL-23^{-/-} foi o grupo de maior lesão, portanto o número de células pode ter relação com a expansão dos linfonodos.

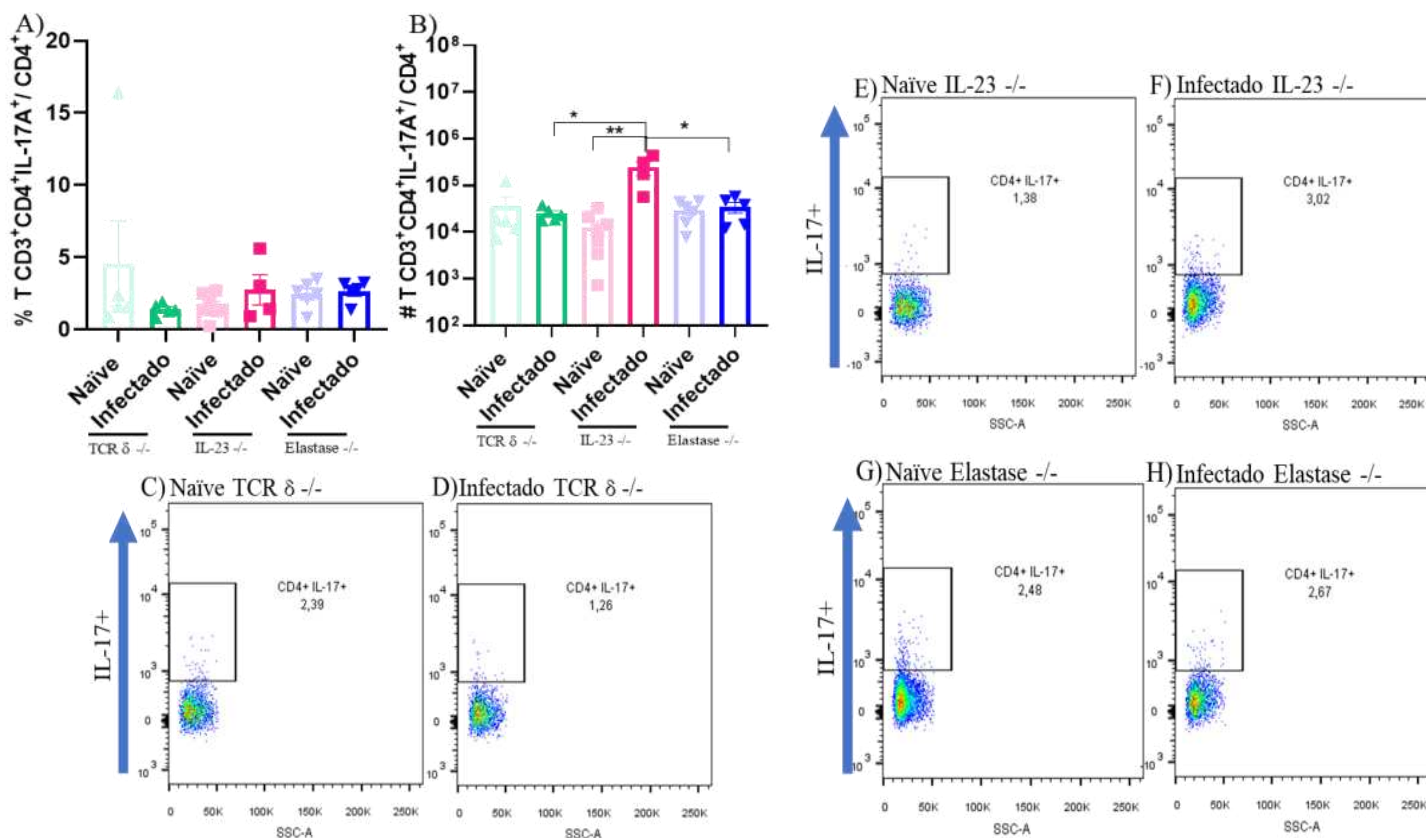


Figura 9 - Os animais IL-23^{-/-} infectados apresentaram maior número de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos TCR delta^{-/-}, IL-23^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naíves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺/CD4⁺ e dot plot representativo (C, E, G) para animais naíves e (D, F, H) para animais infectados. (média \pm SEM o; n = 4-5) * P < 0,5; **P < 0,01, obtido do teste t de Student.

5.7 Os animais IL-23^{-/-} infectados por *Leishmania amazonensis* apresentaram expansão de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ

Foi observado, com relação às células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , um aumento na frequência e número desse tipo celular em camundongos IL-23^{-/-} durante a fase crônica da infecção por *L. amazonensis* (Figura 10a, b). Isso indica que a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ ocorre independentemente da presença de IL-23 e o contexto de infecção é capaz de modular a intensidade de produção. Além disso, seu número e frequência superaram os animais TCR δ e Elastase^{-/-} (Figura 10a, b). Por outro lado, os animais Elastase e TCR. δ ^{-/-} infectados não apresentaram aumento com relação aos seus respectivos camundongos naíves controle (Figura 10a, b). Sugerindo que a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ não é modulada pelo contexto de infecção na ausência de células T $\gamma\delta$ e elastase e é independente de IL-23.

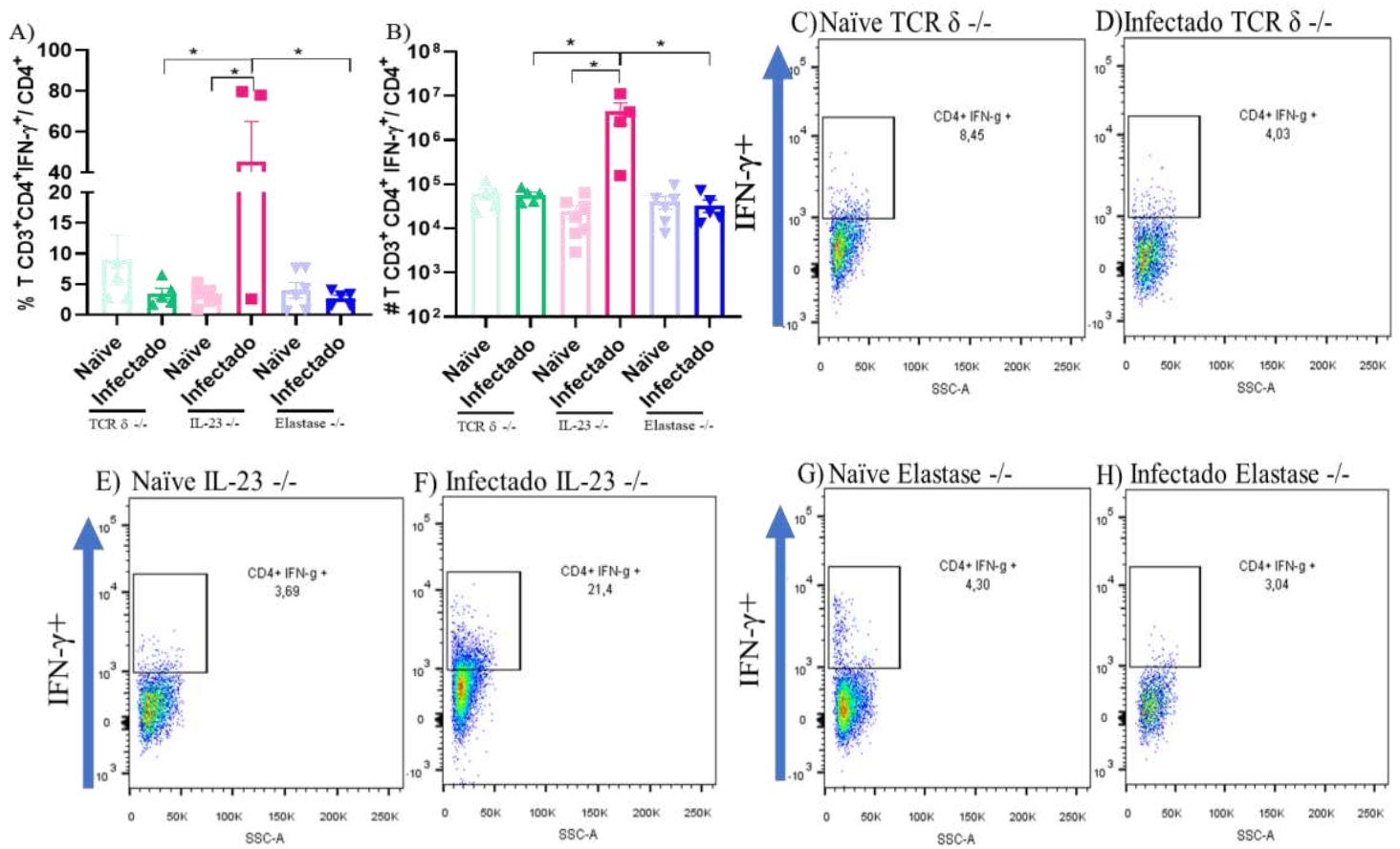


Figura 10 - Os animais IL-23^{-/-} infectados por *Leishmania amazonensis* apresentaram expansão de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ . Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos TCR delta^{-/-}, IL-23^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naïves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺ e dot plot representativo (C, E, G) para animais naïves e (D, F, H) para animais infectados. (média \pm SEM o; n = 4-5) * P < 0,5, obtido do teste t de Student.

5.8 Os animais IL-23^{-/-} exibiram maior número e frequência de células T CD8⁺ produtoras de IL-17A

A presença de células T CD8⁺ produtoras de IL-17A também foi avaliada e foi observado que os animais IL-23^{-/-} infectados por *L. amazonensis* tiveram um aumento do seu número e frequência de células (Figura 11a, b). Além disso, os animais IL-23^{-/-} infectados superaram em número de células T CD8⁺ produtoras de IL-17A os animais TCR $\delta^{-/-}$ infectados, que não apresentaram mudança significativa quando comparados com os animais não infectados (Figura 11a, b). Os animais elastase^{-/-} infectados, por sua vez, também não apresentaram diferença na frequência e/ou número desse tipo celular no contexto da infecção (Figura 11a, b), visto que não foi observada diferença quando comparados ao grupo naïve controle.

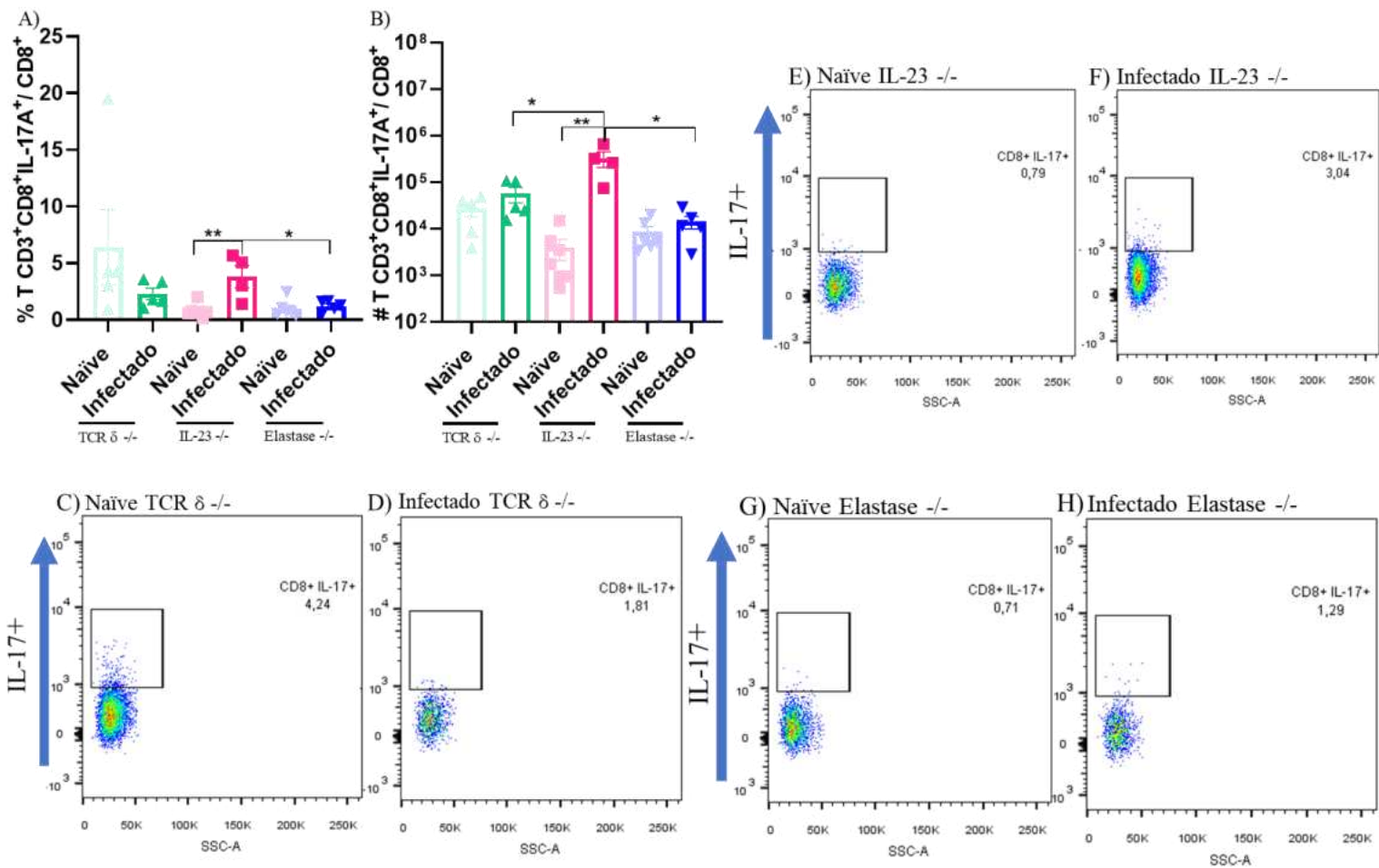


Figura 11 - Os animais IL-23^{-/-} exibiram maior número e frequência de células T CD8⁺ produtoras de IL-17A⁺. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos TCR delta $^{-/-}$, IL-23 $^{-/-}$ e elastase $^{-/-}$ infectados e naïves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺CD8⁺IL-17A⁺/CD8⁺ e dot plot representativo (C, E, G) para animais naïves e (D, F, H) para animais infectados. (média \pm SEM σ ; n = 4-5) * P < 0,5; **P < 0,01, obtido do teste t de Student.

5.10 Os animais IL-23^{-/-} apresentaram expansão de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ

Com relação às células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ , foi visto que os animais IL-23^{-/-} infectados por *L. amazonensis* tiveram um aumento no seu número e frequência de células, se comparados com o seu grupo naïve controle e com os animais infectados TCR δ e Elastase $^{-/-}$. (Figura 12a, b). Enquanto os animais TCR δ ^{-/-} infectados apresentaram diminuição desse tipo celular em relação ao seu grupo naïve (Figura 12a). O grupo elastase $^{-/-}$ não apresentou diferença na frequência e número dessas células em comparação com o seu grupo naïve (Figura 12a, b). Indicando que a produção de IFN- γ por células T CD8⁺ não é modulada no contexto de infecção em animais elastase $^{-/-}$.

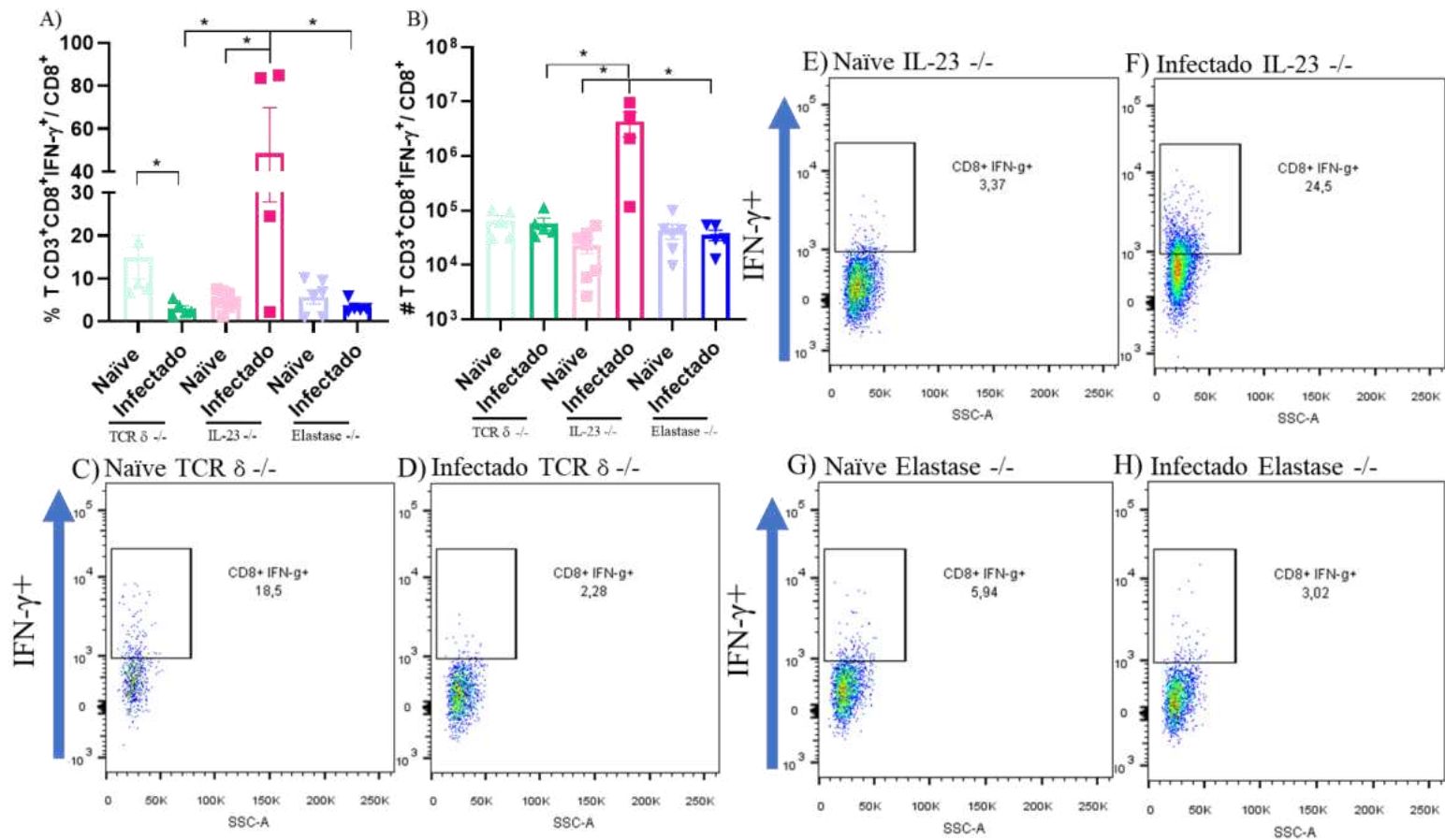


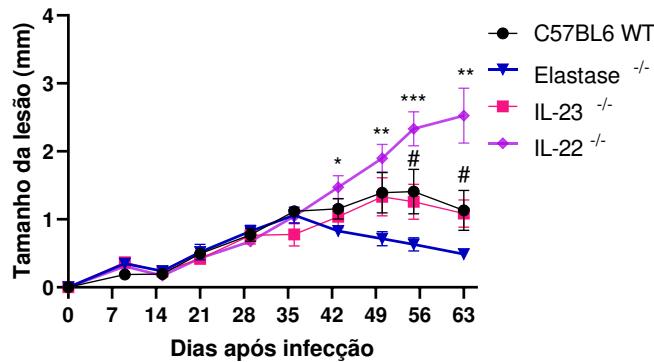
Figura 12 - Os animais IL-23^{-/-} apresentaram expansão de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ . Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos TCR delta^{-/-}, IL-23^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naïves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺/CD8⁺ e dot plot representativo (C, E, G) para animais naïves e (D, F, H) para animais infectados. (média \pm SEM o; n = 4-5) * P < 0,5, obtido do teste t de Student.

5.11 IL-22 pode estar envolvida com a proteção em animais infectados por *L. amazonensis* no pico da infecção.

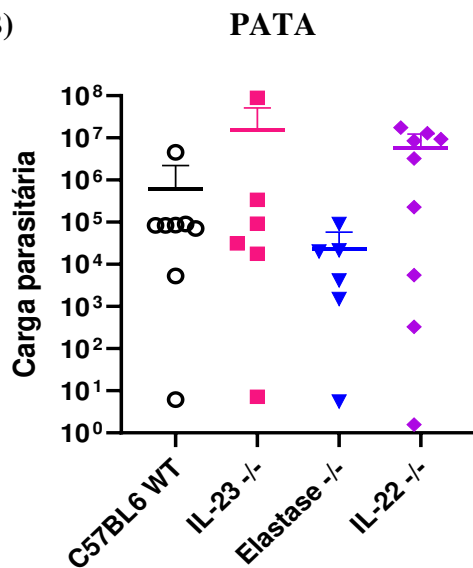
Com o objetivo de avaliar a resposta imune e o papel das sinalizações intermediárias envolvidas na função desempenhada pelas células T $\gamma\delta$ no pico da infecção, animais knockout para IL-23, elastase, TCR δ e C57BL/6 WT como controle, foram infectados com um inóculo de 2×10^6 de *L. amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa). É possível observar que nos 30 dias pós infecção todos os animais apresentavam perfil de lesão similar, porém próximo aos 40 dias após infecção os animais IL-22^{-/-} iniciaram um processo de agravamento da lesão (Figura 13a). Por outro lado, os animais elastase^{-/-} iniciaram um processo de aceleração da resolução da lesão que se manteve até o final do experimento (Figura 13a). Enquanto os animais IL-23 mantêm um perfil de lesão similar ao nosso controle (Figura 13a). Esse resultado indica que a presença de IL-22 é importante no controle do

tamanho da lesão e pode estar associada com a proteção tecidual nesse modelo. Por outro lado, elastase parece desempenhar um papel patogênico no pico da infecção. Para quantificação da carga parasitária foi realizado o LDA a partir do sítio de infecção e linfonodos drenantes. Apesar da diferença significativa no tamanho das lesões entre os animais durante o pico da infecção, não houve impacto na carga parasitária (Figura 13b, c).

A)



B)



C)

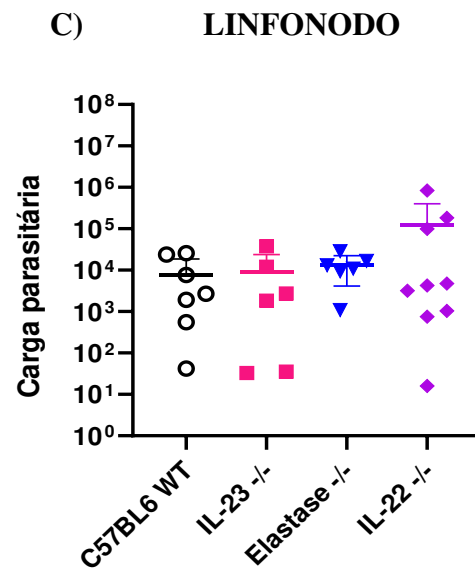


Figura 13 - IL-22 pode estar envolvida com a proteção em animais infectados por *L. amazonensis* no pico da infecção. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As lesões foram acompanhadas semanalmente com o auxílio de um paquímetro ao longo de 63 dias após infecção (A). Ao final do experimento foi realizado o ensaio de diluição limitante (LDA) a partir do principal sítio de infecção (patas) e dos linfonodos poplíteos drenantes, com base nisso foi possível avaliar a carga parasitária por grama de tecido dos camundongos C57BL/6 WT, IL-23^{-/-}, IL-22^{-/-} e elastase^{-/-}, na pata (B) e linfonodos drenantes (C) que apresentaram um perfil similar de carga parasitária em ambos os tecidos. (média SEM; n = 6-9).) * diferença estatística entre elastase^{-/-} e IL-22^{-/-}; # diferença estatística entre IL-22^{-/-} e IL-23^{-/-}; obtido a partir da análise Two-way ANOVA utilizando o pós-teste de Bonferroni.

5.12 Os animais IL-22^{-/-} infectados por *Leishmania amazonensis* apresentaram maior celularidade

Buscando avaliar a resposta imune e o papel das sinalizações intermediárias envolvidas na função desempenhada pelas células T $\gamma\delta$ no pico da infecção, animais knockout para IL-23, IL-22, elastase e C57BL/6 WT como controle, foram infectados com um inóculo de 2×10^6 de *L. amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa). Os linfonodos drenantes dos animais infectados foram coletados, macerados e contados, para posterior análise em citometria de fluxo. Os animais infectados apresentaram maior celularidade, em comparação com os animais naïves (Figura 14a). Especialmente os animais deficientes de IL-22 infectados, apresentaram maior celularidade em comparação com os animais WT naïve (Figura 14a). Isso indica que o contexto da infecção é capaz de modular a quantidade de células presente nos linfonodos drenantes.

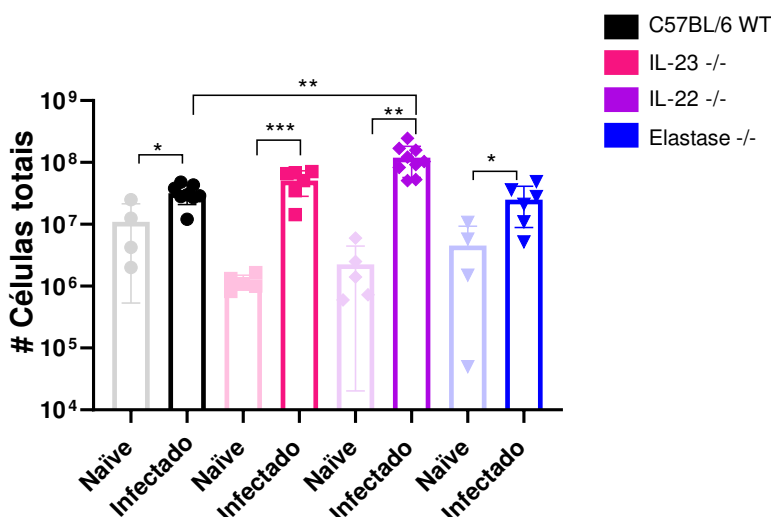


Figura 14 - Celularidade do linfonodo drenante dos animais C57BL/6 WT, TCR delta^{-/-}, IL-23^{-/-}, IL-22^{-/-} e Elastase^{-/-} Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. Ao final do experimento foi realizada a contagem de linfócitos a partir dos linfonodos dos camundongos C57BL/6 WT, IL-23^{-/-}, IL-22^{-/-} e Elastase^{-/-} infectados e não infectados (naïves) usando a câmara de Neubauer. (média \pm SEM $n = 6-9$) * $P < 0,5$; ** $P < 0,01$, obtido do teste t de Student.

Ao quantificarmos as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, foi observado que os animais WT infectados apresentaram maior frequência de células T CD4⁺, comparados com os animais IL-22 e elastase^{-/-} infectados (Figura 15a). Porém, esse padrão não se repete com relação ao número (Figura 15b). Apesar de não haver alteração na frequência, os animais IL-23 e IL-22^{-/-} infectados apresentam maior número de linfócitos T CD4⁺ em comparação aos seus respectivos camundongos naïves controle (Figura 15b). Com destaque para os animais IL-22^{-/-} infectados que superaram em número, os animais deficientes de elastase infectados (Figura 15b). Os animais WT infectados apresentaram maior número de células T CD8⁺, em comparação com IL-22^{-/-} (Figura 15c). Além disso, os animais IL-23 e IL-22^{-/-} apresentaram

maior número de células T CD8⁺, se comparados aos seus respectivos animais naíve controle (Figura 15d). Destacando-se que IL-22 infectados superou em número de células T CD8⁺ todos os animais infectados, WT e deficientes de IL-22 e elastase infectados (Figura 15d). Enquanto os animais elastase^{-/-} infectados não apresentaram aumento em número e frequência de células T CD8⁺ (15c, d).

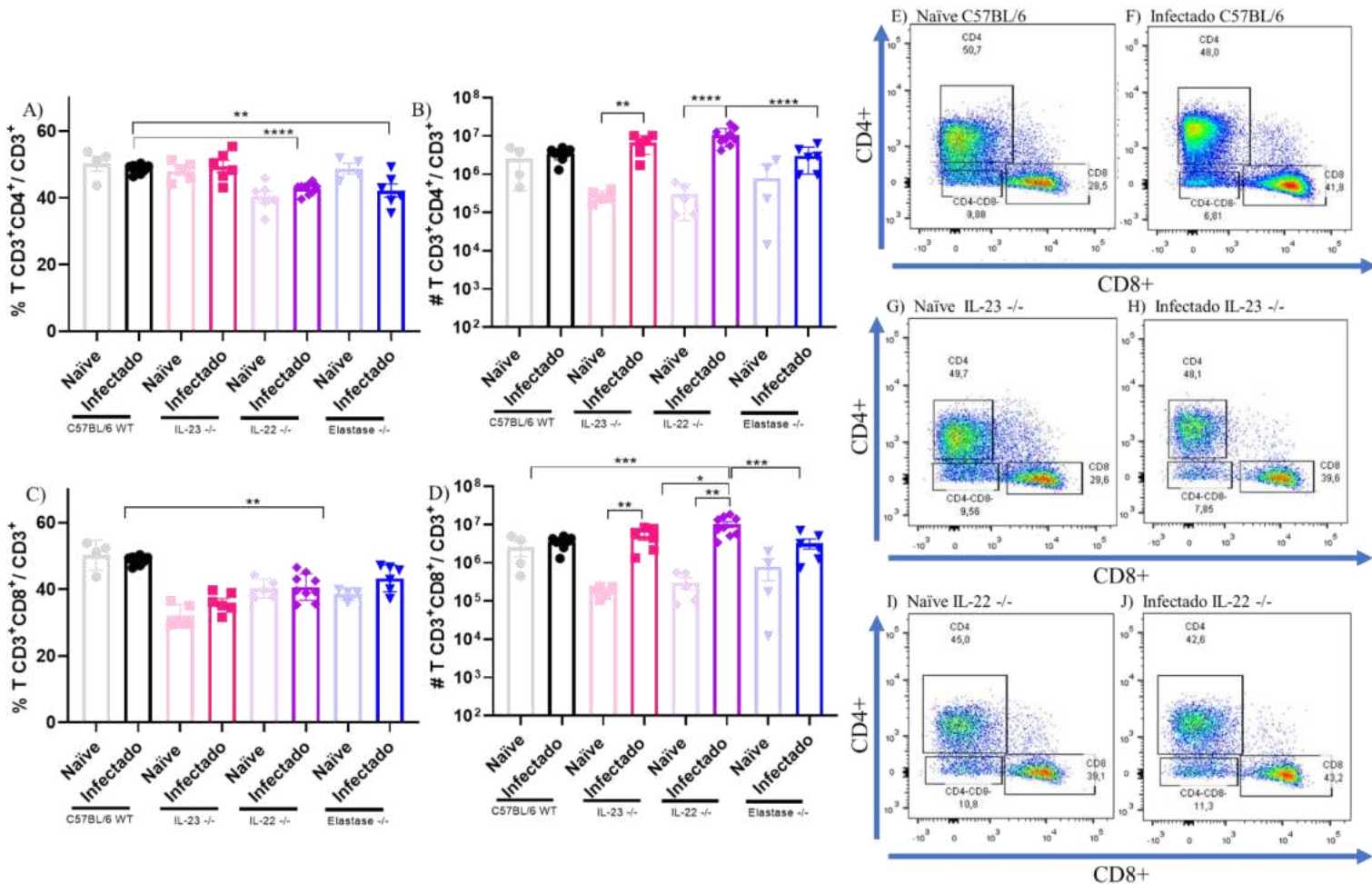


Figura 15 - Análise da frequência e número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no pico da infecção. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. Os linfonodos dos camundongos, IL-23^{-/-}, IL-22^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e não infectados (naíves) foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e coradas para citometria de fluxo; frequência (A) e número total (B) de células T CD4⁺, frequência (C) e número total (D) de células T CD8⁺ e dot plot representativo (G, E, I) para animais naíves e (H, F, J) para animais infectados. (média \pm SEM o; n = 6-9) * P < 0,5; **P < 0,01; ***P < 0,001; P < 0,0001, obtido do teste t de Student.

5.15 Os animais IL-22^{-/-} e IL-23^{-/-} infectados por *Leishmania amazonensis* tiveram um aumento no número de células T $\gamma\delta$

Ao quantificarmos as populações de células T $\gamma\delta$ na citometria de fluxo, foi observado que todos os animais infectados por *Leishmania amazonensis* exibiram menor frequência (Figura 16a) desse tipo celular. Além disso, foi observado aumento no número dos animais IL-23 e IL-22^{-/-} infectados quando comparados ao seu respectivo grupo naíve controle (Figura

16b). Vale ressaltar que o grupo deficiente para IL-22 infectado, apresentou número superior aos animais WT, IL-23^{-/-} e Elastase^{-/-} (Figura 16b) O que pode ter relação com o fato desse grupo ter apresentado maior lesão.

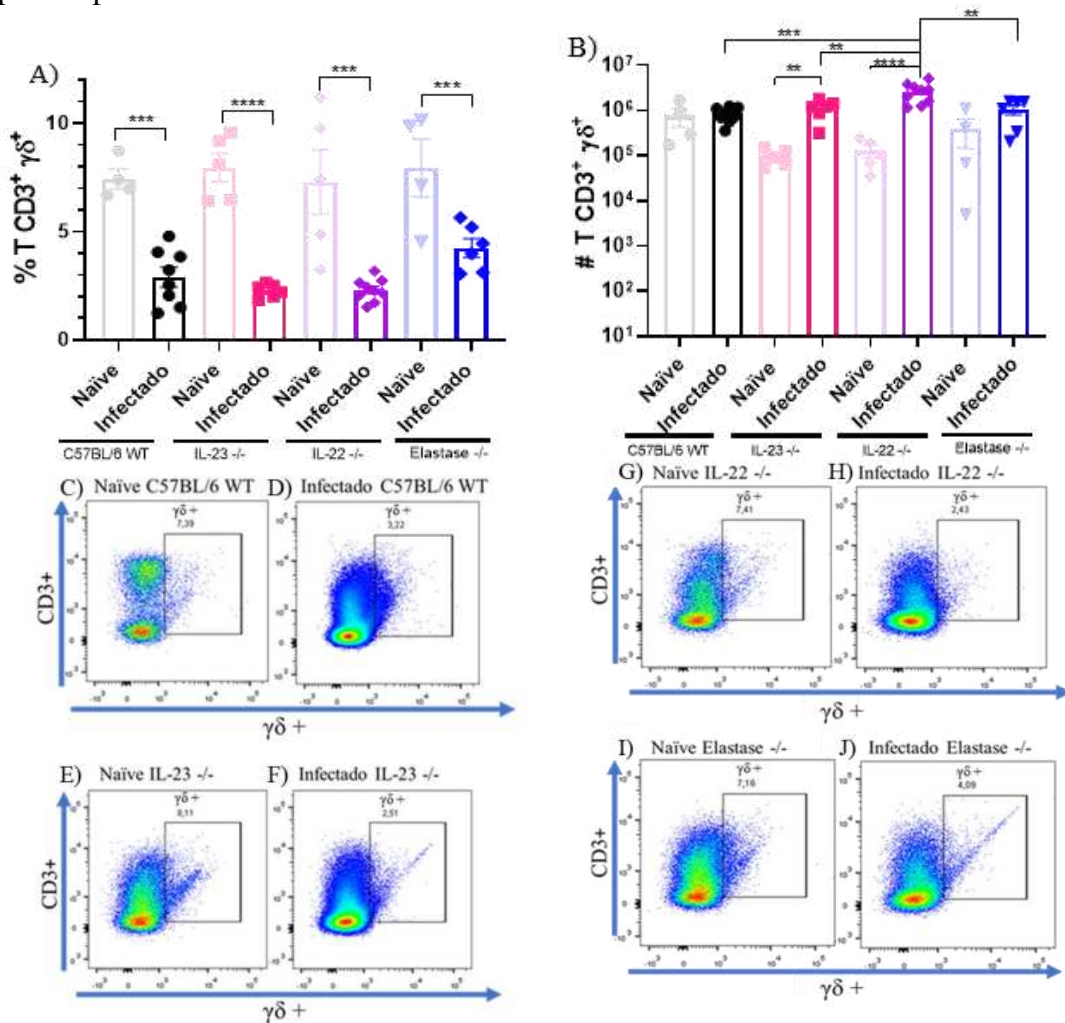


Figura 16 - Os animais IL-22^{-/-} e IL-23^{-/-} infectados por *Leishmania amazonensis* tiveram um aumento no número de células T γδ os camundongos foram infectados com 2x10⁶ promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos C57BL/6 WT, IL-23^{-/-}, IL-22^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naïves foram plaqueadas a 1x10⁶ células por poço e coradas para citometria de fluxo; frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺γδ⁺ e dot plot representativo (C, E, G, I) para animais naïves e (D, F, H, J) para animais infectados.(média ± SEM o; n = 6-9) **P <0,01; ***P <0,001, ****P<0,0001 obtido do teste t de Student.

5.16 Os animais IL-23^{-/-} e IL-22^{-/-} infectados por *L. amazonensis* apresentaram expansão no número de células T γδ produtoras de IL-17A

Na análise das células T γδ produtoras de IL-17A, foi observado que somente os animais IL-22 e IL-23^{-/-} infectados por *L. amazonensis* tiveram o aumento do número de células T γδ produtoras de IL-17A no pico da infecção, quando comparados com os seus respectivos grupos naïve (18b). Porém, em relação a frequência não houve alteração significativa em nenhum dos animais no contexto da infecção (18a). Demonstrando que no pico da infecção IL-22 e IL-23, não parecem desempenhar um papel crucial para a indução

desse tipo celular. Por outro lado, os animais elastase não demonstraram diferença na frequência de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17A, confirmando o dado obtido na fase crônica (7a, b) de que o contexto de infecção não é capaz de modular a indução dessas células.

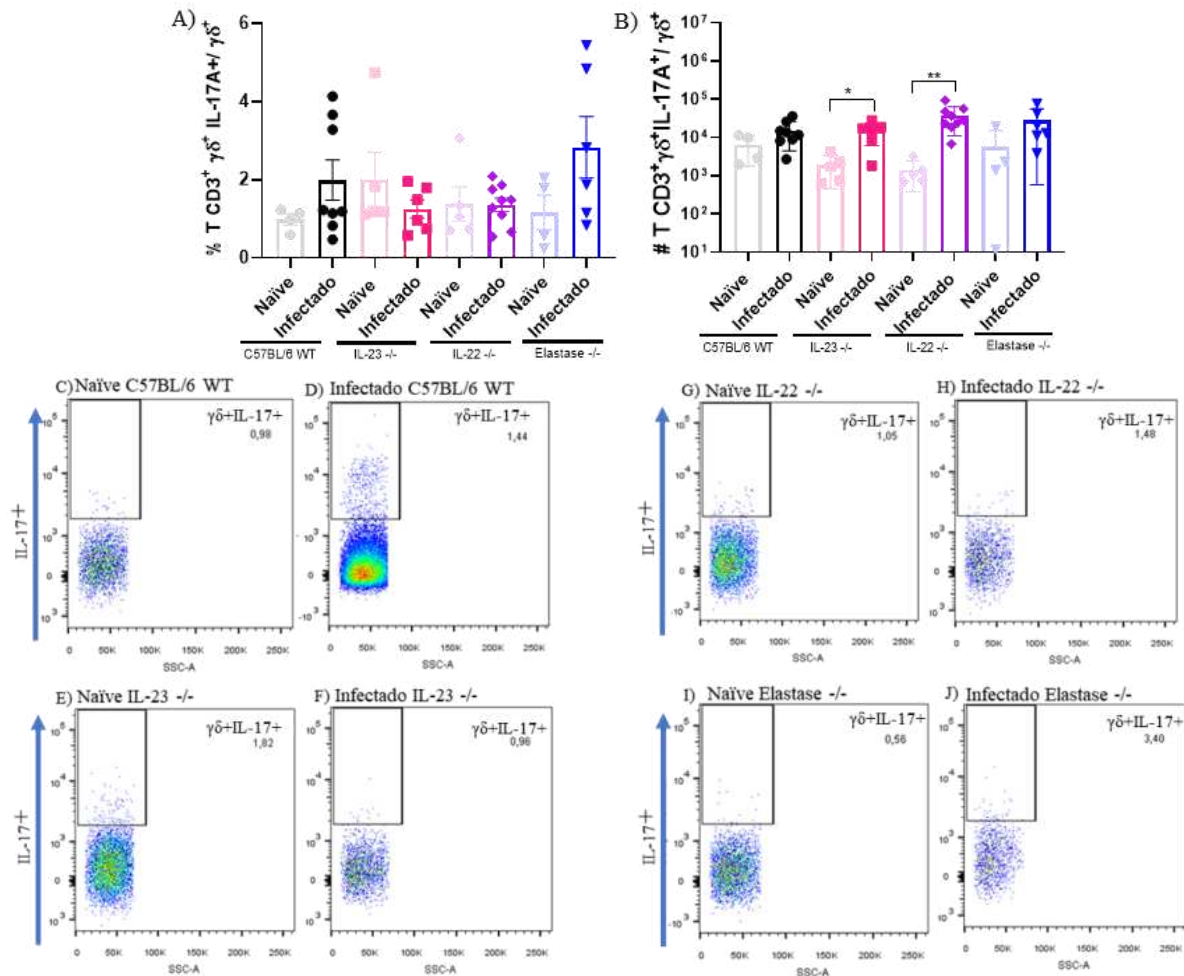


Figura 17 - Os animais IL-23^{-/-} e IL-22^{-/-} infectados por *L. amazonensis* apresentaram expansão no número de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17A Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos C57BL/6 WT, IL-23^{-/-}, IL-22^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naïves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁺IL-17A⁺/ $\gamma\delta$ ⁺ e dot plot representativo (C, E, G, I) para animais naïves e (D, F, H, J) para animais infectados. (média \pm SEM \bar{o} ; n = 6-9) * P < 0,5; **P < 0,01, obtido do teste t de Student.

5.17 Os animais Elastase^{-/-} e WT apresentaram maior frequência de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ se comparados aos animais IL-22^{-/-}

Buscando compreender o impacto da ausência de IL-23, IL-22 e elastase, foi observado maior frequência de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ nos animais Elastase^{-/-} e WT infectados por *L. amazonensis*, se comparados aos animais IL-22^{-/-} infectados. (Figura 18a). Além disso, os animais IL-23^{-/-} infectados apresentaram maior frequência desse tipo celular quando comparados com o seu grupo naïve (Figura 18a). Além disso, os animais IL-23 e IL-

22^{-/-} infectados apresentaram maior número de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ em comparação aos seus respectivos grupos naíve (Figura 18b).

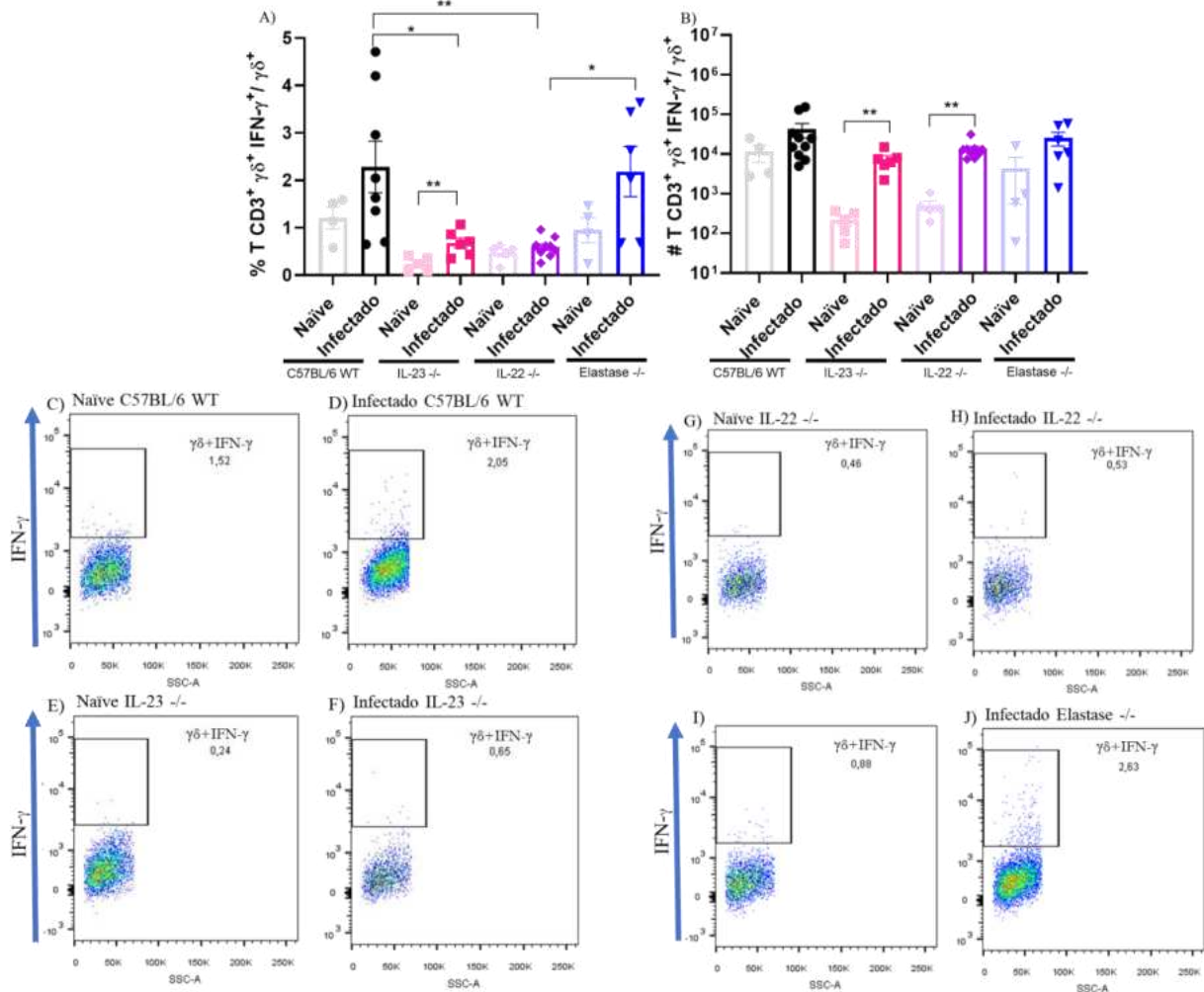


Figura 18 - Os animais Elastase^{-/-} e WT apresentaram maior frequência de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ se comparados aos animais IL-22^{-/-}. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos C57BL/6 WT, IL-23^{-/-}, IL-22^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naíves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁺ IFN- γ ⁺ / $\gamma\delta$ ⁺ e dot plot representativo (C, E, G, I) para animais naíves e (D, F, H, J) para animais infectados. (média \pm SEM \bar{o} ; n = 6-9) * P < 0,5; **P < 0,01, obtido do teste t de Student.

5.18 Os animais Elastase^{-/-} infectados demonstraram maior frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A

Tratando-se das células T CD4⁺ produtoras de IL-17A, foi observado que os animais elastase^{-/-} infectados por *L. amazonensis* obtiveram uma frequência maior de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A, em relação aos outros grupos de animais infectados (Figura 19a). Porém, os animais elastase^{-/-} infectado não apresentaram aumento no número desse tipo celular (Figura 19b). Quanto aos animais IL-23 e IL-22^{-/-}, foi observado que ambos tiveram

um aumento no número de células em comparação com o seu respectivo grupo naïve (Figura 19b).

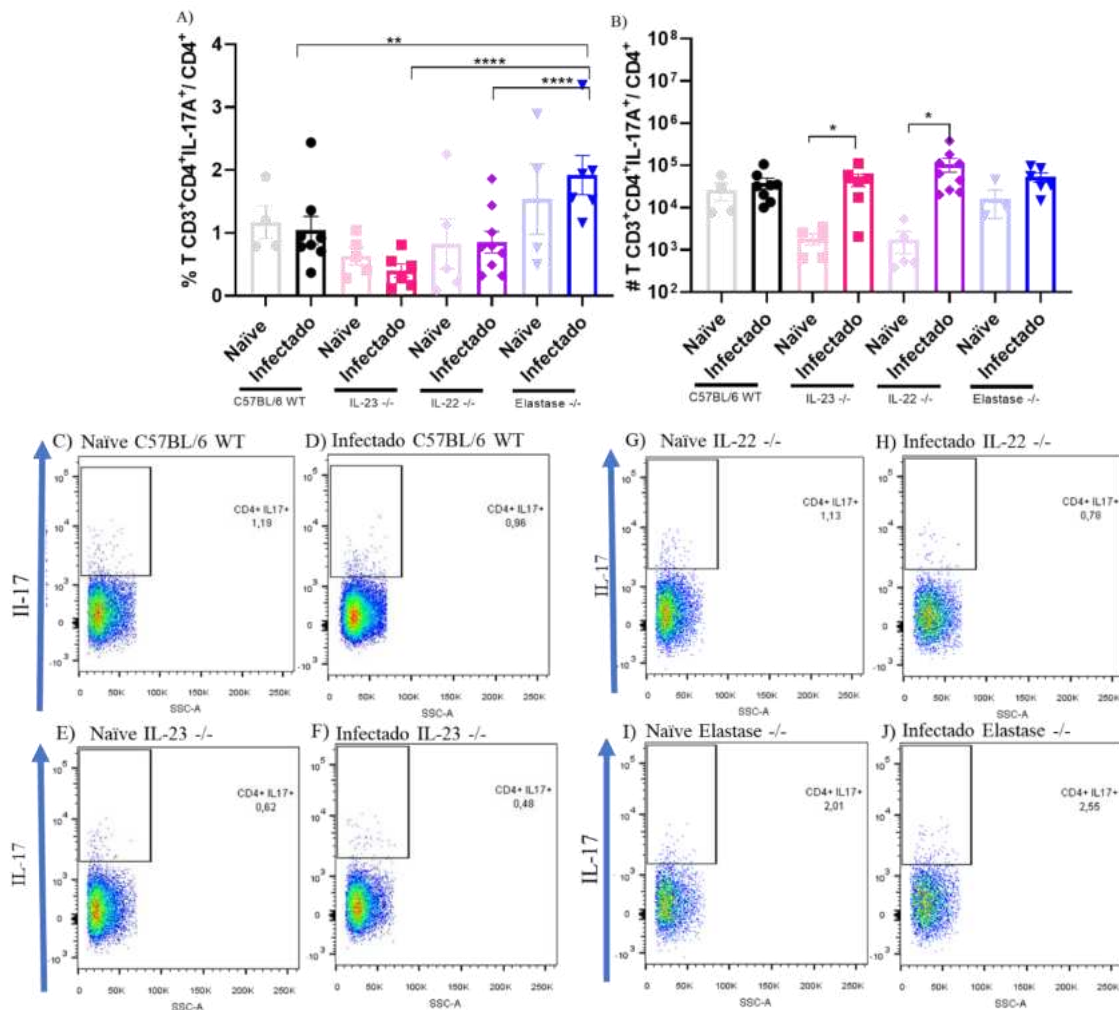


Figura 19 - Os animais Elastase^{-/-} infectados demonstraram maior frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos C57BL/6 WT, IL-23^{-/-}, IL-22^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naïves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺/CD4⁺ e dot plot representativo (C, E, G, I, K) para animais naïves e (D, F, H, J, L) para animais infectados. (média \pm SEM σ ; n = 6-9) * P < 0,5; **P < 0,01; ****P < 0,0001, obtido do teste t de Student.

5.19 Os animais Elastase^{-/-} apresentaram maior frequência e número de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ

Na análise de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ foi possível observar que os animais Elastase^{-/-} infectados por *L. amazonensis* exibiram maior frequência desse tipo celular quando comparados com os animais IL-23 e IL-22^{-/-} infectados (Figura 20a). No entanto, com relação ao número de células, todos os grupos de animais infectados exibiram aumento de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ com relação aos seus respectivos naïves (Figura 20b). Porém, somente

os animais IL-22^{-/-} infectados superaram o número de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ dos animais elastase^{-/-} infectados (Figura 20b).

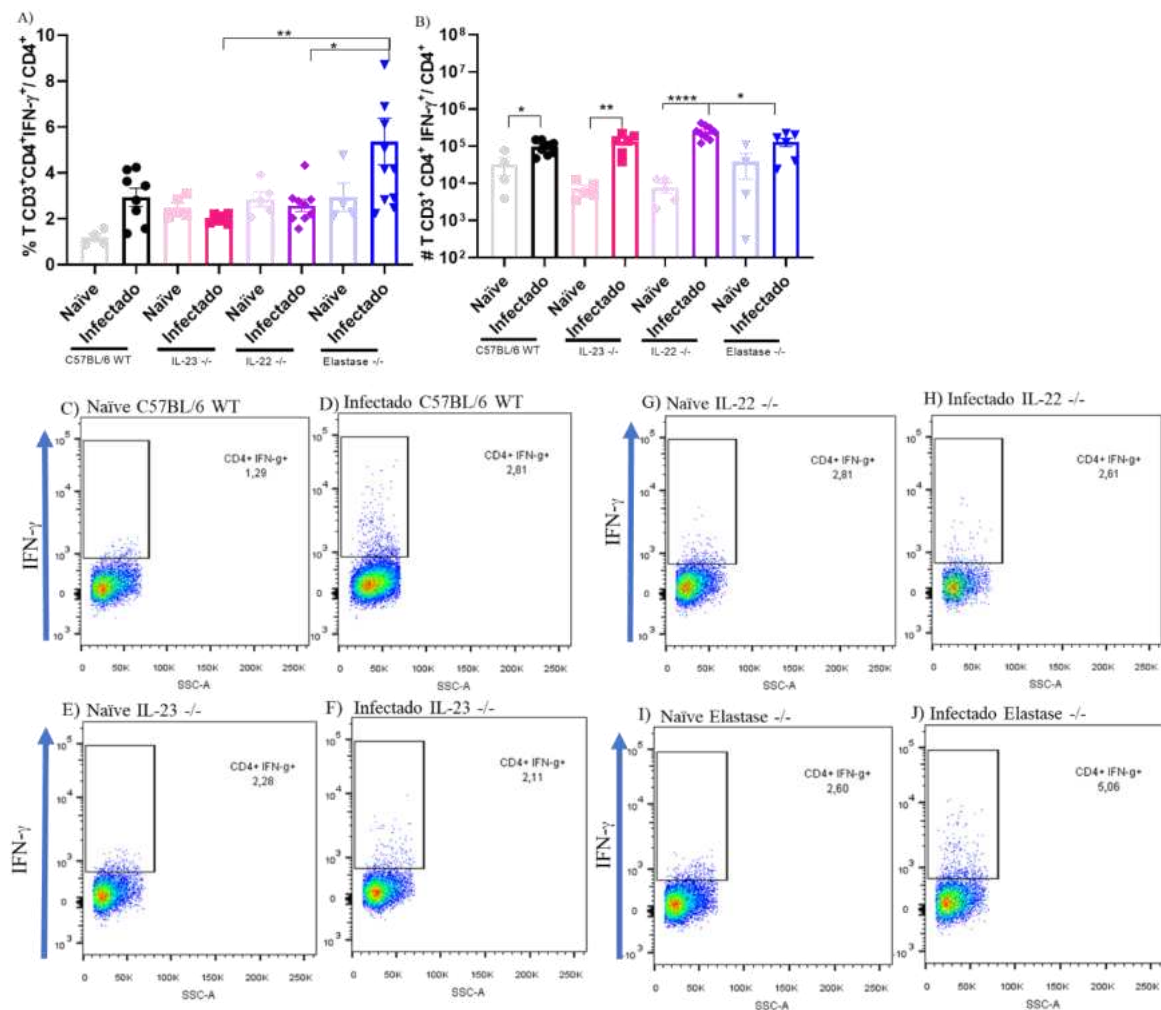


Figura 20 - Os animais Elastase^{-/-} apresentaram maior frequência e número de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ . Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos C57BL/6 WT, TCR delta^{-/-}, IL-23^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naïves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺ e dot plot representativo (C, E, G, I) para animais naïves e (D, F, H, J) para animais infectados. (média \pm SEM o; n = 6-9) * P < 0,5; **P < 0,01; ****P < 0,0001, obtido do teste t de Student.

5.20 Os animais Elastase^{-/-} infectados apresentaram expansão de células T CD8⁺ produtoras de IL-17A

Ao avaliarmos as células T CD8⁺ produtoras de IL-17A foi observado que os animais elastase^{-/-} infectados por *L. amazonensis* foi superior à dos animais IL-23 e IL-22^{-/-} infectados (Figura 21a). Padrão que se repetiu no número desse tipo celular, exceto pelo grupo IL-22^{-/-} infectado, que apresentou aumento somente com relação ao seu grupo naïve controle (Figura 21b). Por fim, foi observado que todos os animais knockouts infectados superaram, em número, a quantidade de células T CD8⁺IL-17A⁺, os seus respectivos naïves (Figura 21b).

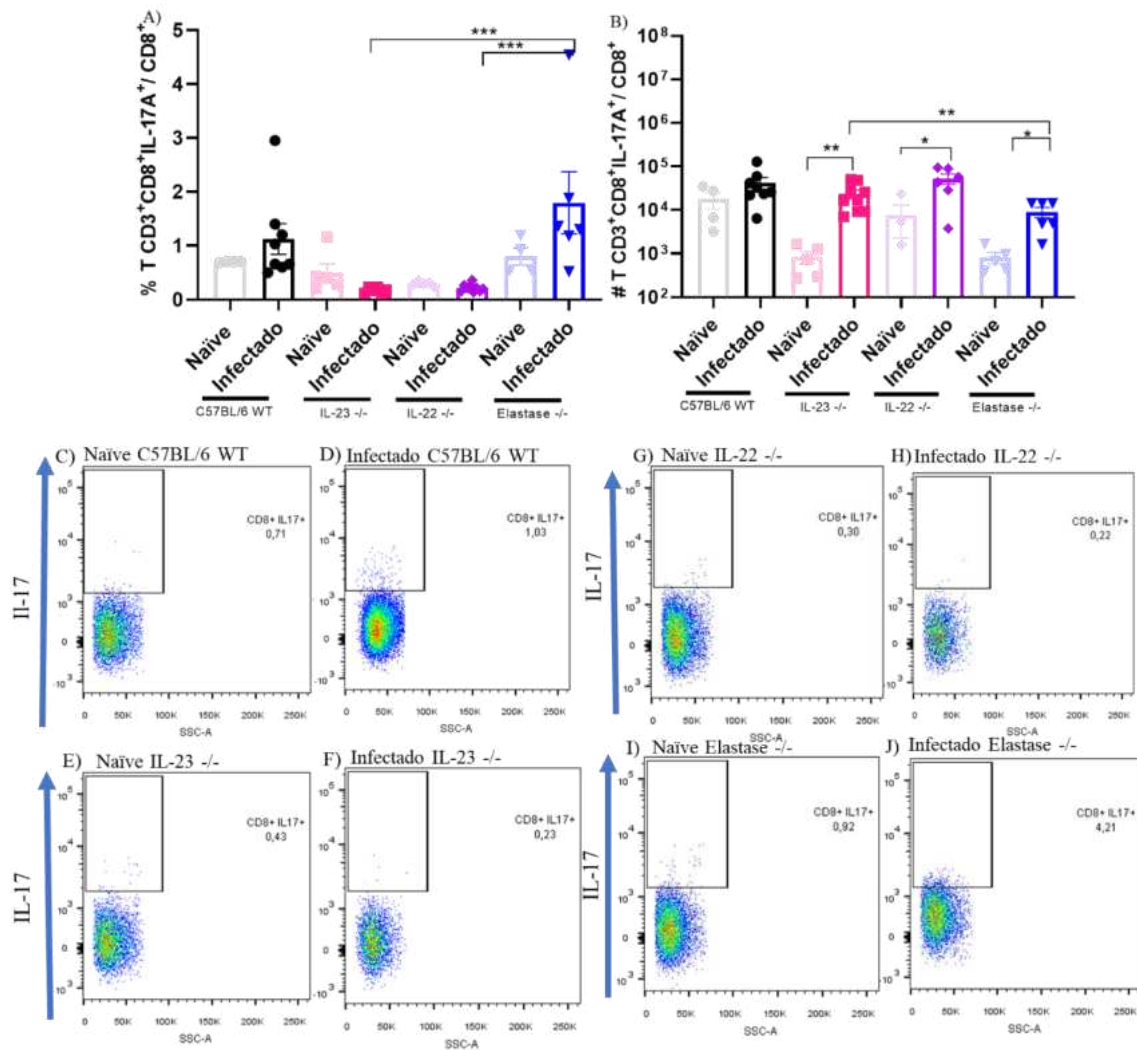


Figura 21 - Os animais Elastase^{-/-}infetados apresentaram expansão de células T CD8⁺ produtoras de IL-17A. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos C57BL/6 WT, IL-23, IL-22^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naïves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺CD8⁺IL-17A⁺/CD8⁺ e dot plot representativo (C, E, G, I, K) para animais naïves e (D, F, H, J, L) para animais infectados. (média \pm SEM σ ; n = 6-9) * P < 0,5; **P < 0,01; ***P < 0,001, obtido do teste t de Student.

5.21 Os animais infectados IL-23^{-/-} e IL-22^{-/-} exibiram diminuição na frequência de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ

Quanto a frequência de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ , foi observado que os animais IL-23 e IL-22^{-/-} infectados por *L. amazonensis* apresentaram diminuição se comparados aos seus respectivos grupos naïve (Figura 22a). Além disso, foi observado aumento do número de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ nos animais IL-23 e IL-22^{-/-} infectados em relação aos seus respectivos grupos naïve controle.

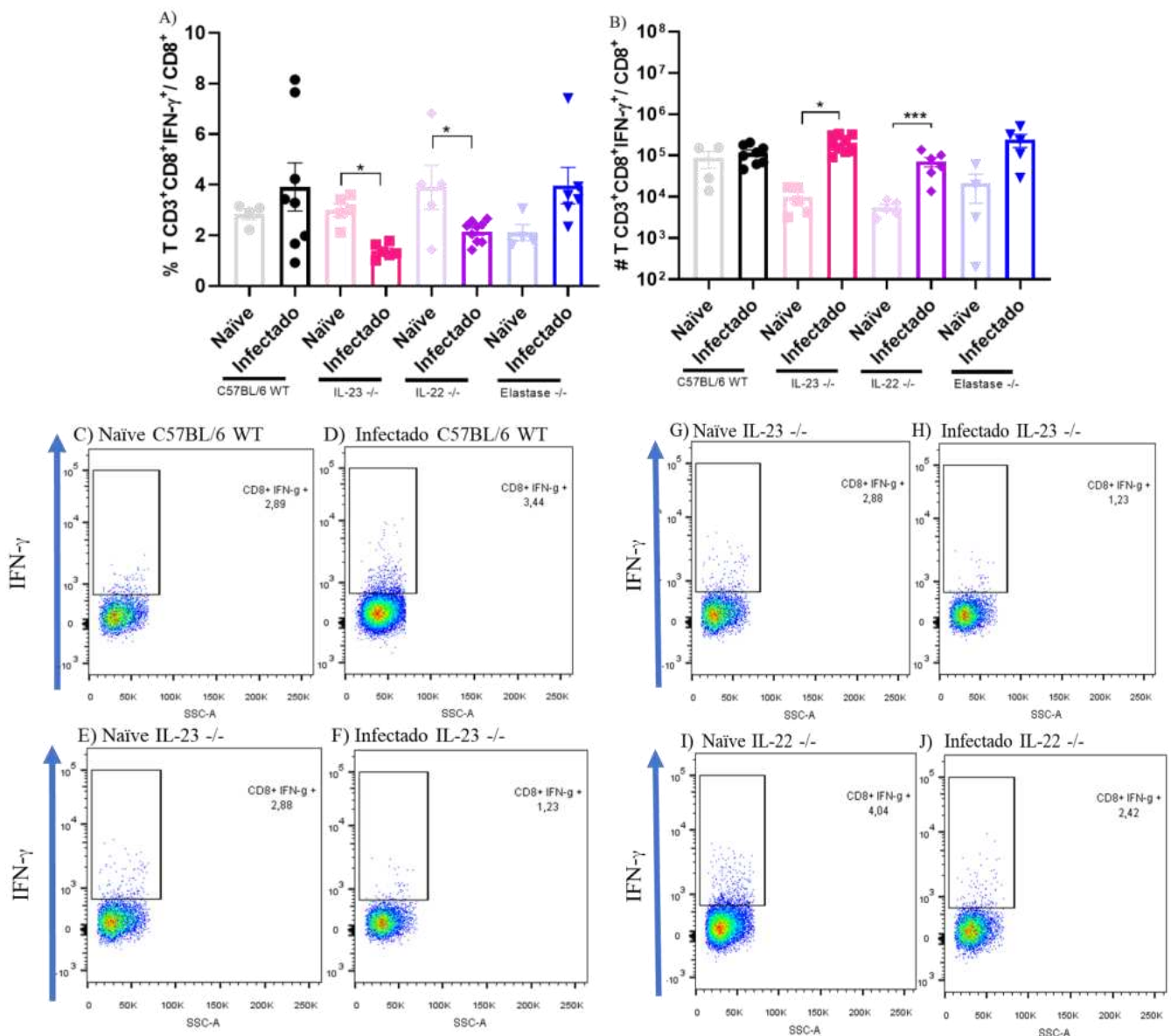


Figura 22 - Os animais infectados IL-23^{-/-}, IL-22^{-/-} exibiram diminuição na frequência de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ . Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata traseira direita. As células dos linfonodos de camundongos C57BL/6 WT, IL-23^{-/-}, IL-22^{-/-} e elastase^{-/-} infectados e naïves foram plaqueadas a 1×10^6 células por poço e reestimuladas durante 4 h com PMA (20ng/mL) e ionomicina (1g/mL) e depois coradas para análise de citometria de fluxo. frequência (A) e número total (B) de células T CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺/CD8⁺ e dot plot representativo (C, E, G, I) para animais naïves e (D, F, H, J) para animais infectados. (média \pm SEM \bar{o} ; n = 6-9) * P < 0,5; **P < 0,01, obtido do teste t de Student.

6. DISCUSSÃO

Em um estudo anterior conduzido por nosso grupo, foi observado que camundongos Sv129 são suscetíveis à infecção por *L. amazonense* apresentam uma expansão de células T $\gamma\delta$ totais, como também, produtoras de IL-17, durante a infecção (Dos-Santos *et al.*, 2019). No entanto, devido à maior disponibilidade de camundongos knockout no background C57BL/6, migrou-se do modelo de Sv129 suscetível, para o modelo experimental em camundongos C57BL/6 parcialmente resistentes. O objetivo foi avaliar o impacto da

deficiência das células T $\gamma\delta$ e outras moléculas, como a elastase neutrofílica, IL-22 e IL-23 durante a infecção por *Leishmania amazonensis*.

Os camundongos C57BL/6 demonstraram ser parcialmente resistentes à infecção por *Leishmania amazonensis* (Pratti, J. E. S. *Et al.*, 2016). Apesar do desenvolvimento da lesão, é comum observar, um controle e subsequente redução da lesão, conforme descrito na literatura (Velasquez, L. G. *et al.*, 2016). Isso diferencia esses camundongos dos suscetíveis BALB/c (Velasquez, L. G. *et al.*, 2016) e Sv129 (Dos-Santos *et al.*, 2019) que apresentam lesão progressiva, sem controle. Apesar do impacto na lesão em camundongos C57BL/6, não ocorre cura, e costuma haver carga parasitária (Felizardo, T. C. *et al.*, 2007; Velasquez, L. G. *et al.*, 2016). Isso é consistente com nossos resultados, onde a lesão é controlada e diminui após atingir o pico. No entanto, persiste uma carga parasitária no local da infecção e nos linfonodos drenantes.

Na literatura, foi demonstrado que a ausência de células T $\gamma\delta$ em camundongos C57BL/6 infectados por *L. major* (cepa LV39) e *L. guyanensis* (cepa M414) não impactou o desenvolvimento da lesão e nem a carga parasitária (Satoskar, A. *et al.*, 1997; Hartley *et al.*, 2016). Entretanto, em nosso modelo, os camundongos C57BL/6 foram infectados por *L. amazonensis* (cepa Josefa), e observamos que, no estágio de pico da lesão, os animais deficientes para essas células T $\gamma\delta$ apresentaram uma lesão menor, indicando uma possível relação entre essas células e a imunopatologia da doença nesse estágio de infecção. No entanto, a carga parasitária não foi afetada, sugerindo um papel modulador de inflamação desempenhado por essas células, não necessariamente associado ao efeito parasitário. Isso reforça que, dependendo da cepa do parasito e do background do animal, as células T $\gamma\delta$ podem atuar de maneira distinta, desempenhando um papel patogênico em nosso modelo.

Além disso, como mencionado anteriormente, o papel dessas células pode ser modulado por citocinas, como a IL-22.

Na literatura, foi observado que a IL-22 desempenha um papel protetor contra o dano tecidual causado por infecções por *L. major* e *L. braziliensis* em camundongos C57BL/6, sem impacto na carga parasitária e alteração no microbioma da pele (Gimblet *et al.*, 2015). É importante mencionar o possível impacto no microbioma nesse caso porque estudos recentes indicam correlação entre o microbioma da pele e a leishmaniose (Gimblet *et al.*, 2017; Farias Amorim *et al.*, 2023), especialmente a cutânea, e é sabido que IL-22 é associado a produção de peptídeos antimicrobianos como mencionado anteriormente (Naik *et al.*, 2012).

Em um modelo de camundongos BALB/c infectados por *L. major* foi observado que a administração da citocina recombinante IL-22, de maneira combinada ou não com IL-12,

demonstrou efetividade frente à infecção, além de ter induzido maiores níveis de produção de IFN- γ e redução de IL-4 (Hezarjaribi *et al.*, 2014), o que foi refletido principalmente na diminuição no tamanho das lesões. Esse padrão parece se repetir em contexto de vacinação com IL-22 e LACK, onde a vacinação também é capaz de induzir IFN- γ e reduzir IL-4 (Hezarjaribi *et al.*, 2013).

Apesar desses achados, há relatos na literatura onde o controle da doença é independente de IL-22, não impactando na carga e lesão. Mas é importante mencionar que, utiliza um inóculo relativamente baixo (10^3) e utiliza *L. major* (Brosch *et al.* 2015). No nosso modelo, porém, os camundongos C57BL/6 são infectados por *L. amazonensis* com um inóculo de 2×10^6 . Nesse caso, a lesão é agravada em camundongos IL-22^{-/-} se comparados com o grupo WT, indicando que a IL-22 desempenha um papel protetor no dano tecidual. No entanto, não houve impacto na carga parasitária.

Além de seu papel protetor na leishmaniose, foi observado em um modelo de infecção por *Plasmodium berghei* ANKA, um parasita intracelular semelhante à *Leishmania*, que a ausência de IL-22 em camundongos il-22 leva à malária cerebral precocemente. No entanto, observa-se menor parasitemia em comparação com camundongos WT, mostrando um papel dicotômico e não completamente estabelecido dessa citocina nesse contexto. Associado a isso, observou-se um aumento na produção de IFN- γ , que provavelmente gerou o impacto na carga parasitária, e diminuição na produção de IL-17 por células T $\gamma\delta$ (Sellau, J. *et al.*, 2016). Ao contrário do que foi observado em nosso modelo, onde a frequência de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ é diminuída, enquanto a frequência de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 não foi impactada.

Além disso, na literatura, em um modelo intestinal de detecção de nutrientes, foi observado que a ausência de células T $\gamma\delta$ resulta no aumento da produção de IL-22 (Sullire, Z. A. *et al.*, 2021). No entanto, nossos dados sugerem que a ausência de IL-22 tem um papel indutor de células T $\gamma\delta$. Dessa forma, são necessários estudos para compreender a influência da ausência da produção de IL-22 sobre as células T $\gamma\delta$ em nosso modelo. Além disso, também é importante entender em nosso modelo qual a principal fonte de IL-22.

Na literatura, foi descrito a presença de IL-23 em conjunto com IL-1 β é capaz de induzir a expressão de IL-17A por células T $\gamma\delta$ murinas (Sutton *et al.*, 2009). Considerando o papel patogênico associado à produção de IL-17 no contexto da leishmaniose (Lopez Kostka *et al.*, 2009; Dos-Santos, J. S., 2019), esperaríamos que a ausência de IL-23 impactasse na produção de IL-17 e, conseqüentemente, na patologia da doença. No entanto, em um modelo

de neovascularização coroidal (CNV), foi observado que a produção de IL-17 por células T $\gamma\delta$ é independente da presença de IL-23 (Hasegawa, E. *et al.*, 2013).

Em um modelo de infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6, foi observado que os animais IL-23^{-/-} apresentaram aumento significativo nas lesões até a décima primeira semana após infecção, porém após 13 semanas as lesões dos knockouts para IL-17 e IL-23 se curaram completamente. No baço dos animais IL-23^{-/-} foi observada maior carga parasitária após 6 semanas de infecção em comparação com o grupo WT, no entanto essa diferença é dissipada a partir da 9ª semana de infecção, indicando que a ausência de IL-23 não impacta na resolução da doença. Quanto ao perfil de citocinas, foi observado nos animais IL-17^{-/-} um aumento de IL-4 e IL-10, indicando um perfil predominantemente Th2 e regulatório, ao passo que, os animais IL-23^{-/-} apresentaram uma produção mais significativa de IFN- γ . Porém, apesar dessas diferenças, o eixo IL-23/IL-17 não influenciou na carga parasitária final e na resolução da lesão (Dietze-Schwonberg *et al.*, 2016).

Entretanto, em camundongos BALB/c infectados por *L. major*, o knockout para IL-23 apresenta menor lesão e não há impacto na carga parasitária, aliado a isso, apresentam um decaimento na produção de IFN- γ (Dietze-schwonberg *et al.*, 2018). Em um estudo humano, foi observado que a sinalização de IL-23 é necessária para a imunidade basal e induzida por IL-23 na produção de IFN- γ em células T $\gamma\delta$ V δ 2⁺, visto que os pacientes que possuíam uma deficiência no receptor de IL-23 apresentavam susceptibilidade mendeliana à doença micobacteriana (MSMD) (Philippot, Q. *et al.*, 2023). Embora isso ainda não tenha sido observado na literatura em infecções por *Leishmania*, nossos achados corroboram com isso, pois os camundongos IL-23^{-/-} obtiveram menor frequência de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ na infecção crônica. Porém, no experimento de fase aguda, há um aumento na frequência e número das células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ .

Em nosso modelo, a ausência de IL-23 não impactou na lesão ao longo do pico da infecção, sofrendo um pequeno aumento na lesão em estágios tardios quando comparados ao WT. Dessa forma, é possível que essa citocina seja importante para o controle da lesão em estágios mais tardios da infecção. Foi observado por Singh, T. P (2021) em um modelo de colonização por *S. epidermidis* e infecção por *L. major* que a produção de IL-17 por ILC3s demanda a presença de IL-23. Porém, nós observamos uma expansão de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 em animais IL-23^{-/-}, sugerindo que a produção de IL-17 por essas células seja independente de IL-23.

Dessa forma, é necessário compreender que o papel desempenhado por essa citocina depende de muitas variáveis, como o background animal, o tamanho do inóculo e a fase da

infecção, visto que em um mesmo modelo utilizando time points diferentes, obtivemos resultados diferentes.

Na literatura, o aumento na produção de IL-17 tem sido frequentemente associado a patogenicidade na leishmaniose, especialmente quando produzida por células T $\gamma\delta$ (Lopez Kostka *et al.*, 2009; Dos-Santos, J. S., 2019). Nesse contexto, observou-se que camundongos BALB/c knockout para IL-17 são parcialmente resistentes à infecção, enquanto os animais BALB/c selvagens são suscetíveis (Lopez Kostka *et al.*, 2009). A sinalização mediada por IL-17A está fortemente associada ao recrutamento de neutrófilos para áreas de inflamação (Ye, P *et al.* 2001; Tesmer, L. A. *et al.*, 2008).

Na co-cultura de células T $\gamma\delta$ ativadas por CD3, foi observada a liberação de elastase por neutrófilos. Aliado a isso, na co-cultura de células T $\gamma\delta$ somente com elastase, ou seja, na ausência de neutrófilos, também há ativação dessas células (Towstyka, N. Y. *et al.*, 2018). É importante ressaltar que a ativação das células T $\gamma\delta$ está intrinsecamente ligada ao estado de ativação dessas células. Os neutrófilos, por exemplo, têm a capacidade de inibir as células T $\gamma\delta$ quando estas estão ativadas por HMBPP, de maneira dependente do efeito ROS (Sabbione, F. *et al.*, 2014). Dessa forma, nesse contexto parece haver dependência da ação de neutrófilos, uma vez que essa inibição é mediada por neutrófilos viáveis, porém os apoptóticos não possuem essa capacidade. De modo que, na presença de neutrófilos apoptóticos a carga parasitária em macrófagos humanos infectados por *L. amazonensis* é aumentada (Afonso, L. *et al.*, 2008). Contudo, ao introduzir o inibidor de NE, nota-se que a redução na ativação das células T $\gamma\delta$, mediada pelos neutrófilos e induzida pelo HMBPP, é mais pronunciada em comparação com a condição sem o inibidor (Towstyka, *et al.*, 2018).

Nesse sentido, espera-se que os animais knockout para a elastase sofram algum impacto na resposta mediada por neutrófilos. Dias, B. T. *et al.*, 2019 descreveram que, no contexto da leishmaniose visceral causada por *Leishmania donovani*, a ausência da elastase neutrofílica (ela2) parece ser benéfica, uma vez que os camundongos knockout apresentaram redução na carga parasitária no fígado e baço quando comparados aos camundongos do tipo selvagem. No entanto, nossos dados indicam que a ativação de células T $\gamma\delta$ na ausência de NE no modelo C57BL/6 infectado por *L. amazonensis* afeta o eixo célula T $\gamma\delta$ /IL-17, correlacionando-se com o menor tamanho da lesão em camundongos, apesar da ausência de alteração na carga parasitária. Isso sugere que não há uma relação direta entre essa molécula e o killing parasitário, mas provavelmente está associada a um mecanismo inflamatório.

Em síntese, nossos estudos proporcionaram resultados relevantes sobre os mecanismos imunológicos nos quais as sinalizações intermediárias realizadas por citocinas e elastase,

influenciam na função desempenhada pelas células T $\gamma\delta$ durante a infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos C57BL/6. A transição do modelo suscetível Sv129 para o modelo C57BL/6 parcialmente resistente permitiu avaliar o impacto da deficiência de células T $\gamma\delta$, elastase neutrofílica, IL-22 e IL-23 durante a infecção. Em conjunto, esses achados contribuem para um entendimento mais abrangente das interações imunológicas na leishmaniose, fornecendo informações importantes para futuras pesquisas e estratégias terapêuticas.

7. CONCLUSÃO

- Elastase e Células T $\gamma\delta$ estão associadas ao agravamento da lesão no pico da infecção e fase crônica da infecção por *L. amazonensis*.
- IL-22 pode estar envolvida com a proteção do dano tecidual, mas não na carga parasitária em camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis* no pico da infecção.
- A ausência de IL-22 está associada ao aumento do número de células T $\gamma\delta$ totais em camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis* no pico da infecção.
- A produção de IL-17A e IFN- γ por células T $\gamma\delta$ parece ser independente da presença de IL-23 durante a fase crônica da infecção por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6

REFERÊNCIAS

- ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 691–703, dez. 2014.
- AFONSO, L. *et al.* Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 2, p. 389–396, ago. 2008.
- ANTOINE, J.-C. *et al.* The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 392–401, out. 1998.
- BATES, P. A. The Developmental Biology of *Leishmania* Promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 215–218, 1 set. 1994.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, ago. 2007.
- BERGSTRESSER, P. R. *et al.* Origin and Function of Thy-1+ Dendritic Epidermal Cells in Mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 85, n. 1, p. S85–S90, jul. 1985.
- BONNEVILLE, M.; O'BRIEN, R. L.; BORN, W. K. $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 7, p. 467–478, jul. 2010.
- BRINKMANN, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 5 mar. 2004.
- BROSCH, S. *et al.* Disease Control in Cutaneous Leishmaniasis Is Independent of IL-22. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 1, p. 308–311, jan. 2015.
- CHIEN, Y. *et al.* A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. **Nature**, v. 327, n. 6124, p. 677–682, jun. 1987.
- CHIEN, Y.; MEYER, C.; BONNEVILLE, M. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. **Annual Review of Immunology**, v. 32, p. 121–155, 2014.
- CHRISTENSEN, S. M. *et al.* Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007152, 7 mar. 2019.
- CHUNG, Y. *et al.* Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. **Cell Research**, v. 16, n. 11, p. 902–907, nov. 2006.
- CIRIC, B. *et al.* IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 182, n. 9, p. 5296–5305, 1 maio 2009.

CONTI, H. R. et al. Oral-resident natural Th17 cells and $\gamma\delta$ T cells control opportunistic *Candida albicans* infections. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 10, p. 2075–2084, 22 set. 2014.

COSSARIZZA, A. et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). **European Journal of Immunology**, v. 49, n. 10, p. 1457–1973, out. 2019.

COSTA, G. et al. Control of *Plasmodium falciparum* erythrocytic cycle: $\gamma\delta$ T cells target the red blood cell-invasive merozoites. **Blood**, v. 118, n. 26, p. 6952–6962, 22 dez. 2011.

DARABI, H. et al. Expansion of $\gamma\delta$ T cells in patients infected with cutaneous leishmaniasis with and without glucantime therapy. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 5, out. 2002.

DE VRIES, H. J. C.; SCHALLIG, H. D. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 23, n. 6, p. 823–840, 2022

DEY, R. et al. Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell Host & Microbe**, v. 23, n. 1, p. 134–143.e6, jan. 2018.

DENG, J.; YIN, H. Gamma delta ($\gamma\delta$) T cells in cancer immunotherapy; where it comes from, where it will go? **European Journal of Pharmacology**, v. 919, p. 174803, mar. 2022.

DEROOST, K.; LANGHORNE, J. Gamma/Delta T Cells and Their Role in Protection Against Malaria. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2973, 20 dez. 2018.

DIAS, B. T. et al. Neutrophil elastase promotes *Leishmania donovani* infection via interferon- β . **The FASEB Journal**, v. 33, n. 10, p. 10794–10807, out. 2019.

DIETZE-SCHWONBERG, K. et al. Parasite Clearance in Leishmaniasis in Resistant Animals Is Independent of the IL-23/IL-17A Axis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 9, p. 1906–1908, set. 2016.

DIETZE-SCHWONBERG, K. et al. Insufficient generation of Th17 cells in IL-23p19-deficient BALB/c mice protects against progressive cutaneous leishmaniasis. **Experimental Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 101–103, jan. 2018.

DIETZE-SCHWONBERG, K. et al. IL-17A/F in *Leishmania major*-resistant C57BL/6 mice. **Experimental Dermatology**, v. 28, n. 3, p. 321–323, mar. 2019.

DOS-SANTOS, J. S. et al. Characterization of Sv129 Mice as a Susceptible Model to *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Medicine**, v. 6, p. 100, 29 maio 2019.

DUDLEY, E. C. et al. $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells can share a late common precursor. **Current Biology**, v. 5, n. 6, p. 659–669, jun. 1995.

DUNNING, N. *Leishmania* vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. **Bioscience Horizons**, v. 2, n. 1, p. 73–82, 17 fev. 2009.

FELIZARDO, T. C. *et al.* Leishmania (*Leishmania*) amazonensis infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. **Parasitology**, v. 134, n. 12, p. 1699–1707, nov. 2007.

FARIAS AMORIM, C. *et al.* Multiomic profiling of cutaneous leishmaniasis infections reveals microbiota-driven mechanisms underlying disease severity. **Science Translational Medicine**, v. 15, n. 718, p. eadh1469, 18 out. 2023.

GIMBLET, C. *et al.* IL-22 Protects against Tissue Damage during Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0134698, 18 ago. 2015.

GIMBLET, C. *et al.* Cutaneous leishmaniasis induces a transmissible dysbiotic skin microbiota that promotes skin inflammation. **Cell host & microbe**, v. 22, n. 1, p. 13–24.e4, 12 jul. 2017.

GIRARDI, M. *et al.* Regulation of Cutaneous Malignancy by $\gamma\delta$ T Cells. **Science**, v. 294, n. 5542, p. 605–609, 19 out. 2001.

GUIMARAES-COSTA, A. B. *et al.* A sand fly salivary protein acts as a neutrophil chemoattractant. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 3213, 28 maio 2021.

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

HARTLEY, M.-A. *et al.* Leishmanivirus-Dependent Metastatic Leishmaniasis Is Prevented by Blocking IL-17A. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005852, 22 set. 2016.

HASEGAWA, E. *et al.* IL-23–Independent Induction of IL-17 from $\gamma\delta$ T Cells and Innate Lymphoid Cells Promotes Experimental Intraocular Neovascularization. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 4, p. 1778–1787, 15 fev. 2013.

HAMADA, H. *et al.* Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 182, n. 6, p. 3469–3481, 15 mar. 2009.

HEZARJARIBI, H. Z. *et al.* Evaluation of protective effect of IL-22 and IL-12 on cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 940–945, dez. 2014

HEZARJARIBI, H. Z. *et al.* Effect of IL-22 on DNA vaccine encoding LACK gene of *Leishmania major* in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 341–348, jul. 2013.

HOMMEL, M. *et al.* Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 89, n. sup1, p. 55–73, dez. 1995.

HOSHINO, H. *et al.* Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 1, p. 143–149, jan. 2000.

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

IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1218–1222, maio 2006.

JAMESON, J. et al. A Role for Skin $\gamma\delta$ T Cells in Wound Repair. **Science**, v. 296, n. 5568, p. 747–749, 26 abr. 2002.

JUNGHAEE, M.; RAYNES, J. G. **Leishmania lipophosphoglycan and MAP kinase pathways**. FASEB journal. **Anais...**Federation of American Society of Experimental Biology, 2002. Disponível em: <<https://researchonline.lshtm.ac.uk/id/eprint/16509/>>. Acesso em: 13 dez. 2023

JUNQUEIRA, C. *et al.* $\gamma\delta$ T cells suppress Plasmodium falciparum blood-stage infection by direct killing and phagocytosis. **Nature Immunology**, v. 22, n. 3, p. 347–357, mar. 2021.

KOBAYASHI, F. et al. Plasmodium berghei XAT: Contribution of $\gamma\delta$ T cells to host defense against infection with blood-stage nonlethal malaria parasite. **Experimental Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 368–375, dez. 2007.

KOLLS, J. K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467–476, out. 2004.

KHAIRALLAH, C.; DÉCHANET-MERVILLE, J.; CAPONE, M. $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 9 fev. 2017.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, maio 2003.

LAWAND, M.; DÉCHANET-MERVILLE, J.; DIEU-NOSJEAN, M.-C. Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 761, 30 jun. 2017.

Leishmaniose - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em:

<<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>>. Acesso em: 31 maio. 2023.

Leishmanioses: Ministério da Saúde alerta para prevenção. Disponível em:

<<https://www.google.com/url?q=https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/agosto/leishmanioses-ministerio-da-saude-alerta-para-prevencao&sa=D&source=docs&ust=1683494660432026&usg=AOvVaw3AbgUVZj9ULlv94ExziJ4f>>. Acesso em: 7 maio. 2023.

LLANOS-CUENTAS, E. A. Estudo clínico evolutivo da leishmaniose em area endemica de leishmania brasiliensis brasiliensis. p. 157–157, 1984.

LOPEZ KOSTKA, S. *et al.* IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039–3046, 1 mar. 2009.

- MALIK, S.; WANT, M. Y.; AWASTHI, A. The Emerging Roles of Gamma–Delta T Cells in Tissue Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 29 jan. 2016.
- MARRACK, P.; KAPPLER, J. The T Cell Receptor. **Science**, v. 238, n. 4830, p. 1073–1079, 20 nov. 1987.
- MARTIN, B. *et al.* Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Selectively Expand in Response to Pathogen Products and Environmental Signals. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 321–330, 21 ago. 2009.
- MCGEACHY, M. J. *et al.* TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell–mediated pathology. **Nature Immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390–1397, dez. 2007.
- MCGEE, H. M. *et al.* Interleukin-22 promotes fibroblast- mediated wound repair in the skin. **The Journal of investigative dermatology**, v. 133, n. 5, p. 1321–1329, maio 2013.
- MIRANDA LESSA, M. *et al.* Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 73, n. 6, p. 843–847, nov. 2007.
- NAIK, S. *et al.* Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1115–1119, 31 ago. 2012.
- NASCIMENTO, M. S. L. *et al.* Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon γ to Promote Protection Against *Leishmania infantum* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015–1026, 15 mar. 2015.
- O'BRIEN, R. L.; BORN, W. K. Dermal $\gamma\delta$ T cells – What have we learned? **Cellular Immunology**, v. 296, n. 1, p. 62–69, jul. 2015.
- O'BRIEN, R. L.; ROARK, C. L.; BORN, W. K. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells: FORUM. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 3, p. 662–666, mar. 2009.
- PAMPLONA, A.; SILVA-SANTOS, B. $\gamma\delta$ T cells in malaria: a double-edged sword. **The FEBS Journal**, v. 288, n. 4, p. 1118–1129, fev. 2021.
- PAPOTTO, P. H.; RIBOT, J. C.; SILVA-SANTOS, B. IL-17+ $\gamma\delta$ T cells as kick-starters of inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 6, p. 604–611, jun. 2017.
- PETERS, N. C. *et al.* In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago. 2008.
- PENNINGTON, D. J.; SILVA-SANTOS, B.; HAYDAY, A. C. $\gamma\delta$ T cell development — having the strength to get there. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 2, p. 108–115, abr. 2005.
- PINHEIRO, R. O. *et al.* Protection against cutaneous leishmaniasis by intranasal vaccination with lipophosphoglycan. **Vaccine**, v. 25, n. 14, p. 2716–2722, mar. 2007.
- PINTO, E. F.; DE MELLO CORTEZIA, M.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, n. 25–26, p. 3534–3541, set. 2003.

PITTA, M. G. R. *et al.* IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**, p. JCI38813, 13 jul. 2009.

PHILIPPOT, Q. *et al.* Human IL-23 is essential for IFN- γ -dependent immunity to mycobacteria. **Science Immunology**, v. 8, n. 80, p. eabq5204, 24 fev. 2023.

PRATTI, J. E. S. *et al.* Efficacy of intranasal LaAg vaccine against *Leishmania amazonensis* infection in partially resistant C57Bl/6 mice. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 534, 6 out. 2016.

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

RIBEIRO, C. S. *et al.* Cellular infiltrate in cutaneous leishmaniasis lesions and therapeutic outcome. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, p. 544–550, 18 out. 2021.

RIBOT, J. C.; LOPES, N.; SILVA-SANTOS, B. $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 4, p. 221–232, abr. 2021.

RIGAU, M. *et al.* Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by $\gamma\delta$ T cells. **Science**, v. 367, n. 6478, p. eaay5516, 7 fev. 2020.

RIOL-BLANCO, L. *et al.* IL-23 Receptor Regulates Unconventional IL-17-Producing T Cells That Control Bacterial Infections. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 4, p. 1710–1720, 15 fev. 2010.

ROSAT, J. P.; MACDONALD, H. R.; LOUIS, J. A. A role for gamma delta + T cells during experimental infection of mice with *Leishmania major*. **J Immunol**. 150(2):550-5. 1993

SABBIONE, F. *et al.* Neutrophils suppress $\gamma\delta$ T-cell function. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 3, p. 819–830, mar. 2014.

SATOSKAR, A.; OKANO, M.; DAVID, J. R. $\gamma\delta$ T Cells Are Not Essential for Control of Cutaneous *Leishmania major* Infection in Genetically Resistant C57BL/6 Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 6, p. 1649–1652, dez. 1997.

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

SELLAU, J. *et al.* IL-22 dampens the T cell response in experimental malaria. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28058, 17 jun. 2016.

SHARP, L. L. *et al.* Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. **Nature Immunology**, v. 6, n. 1, p. 73–79, jan. 2005.

SHIBATA, K. *et al.* Resident V δ 1+ $\gamma\delta$ T Cells Control Early Infiltration of Neutrophils after *Escherichia coli* Infection via IL-17 Production. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4466–4472, 1 abr. 2007.

SINGH, T. P. *et al.* Microbiota instruct IL-17A-producing innate lymphoid cells to promote skin inflammation in cutaneous leishmaniasis. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 10, p. e1009693, de out. de 2021.

SRIVASTAVA, A. et al. Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania donovani* amastigote-specific antigens. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 359, n. 1–2, p. 359–368, jan. 2012.

SULLIVAN, Z. A. et al. $\gamma\delta$ T cells regulate the intestinal response to nutrient sensing. *Science*, v. 371, n. 6535, p. eaba8310, 19 mar. 2021.

SUTTON, C. E. et al. Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from $\gamma\delta$ T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity. *Immunity*, v. 31, n. 2, p. 331–341, ago. 2009.

Teixeira E.D, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, de-Souza W. Consórcio CEDERJ. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. Dirceu Esdras Teixeira et al., 1. ed. Rio de Janeiro/RJ, p 5-12,15-19. 2013.

TESMER, L. A. et al. Th17 cells in human disease. *Immunological Reviews*, v. 223, n. 1, p. 87–113, jun. 2008.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review, *F1000Research*, v. 6, p. 750, 26 maio 2017.

TOULON, A. et al. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *Journal of Experimental Medicine*, v. 206, n. 4, p. 743–750, 13 abr. 2009.

TODARO, M. et al. Efficient Killing of Human Colon Cancer Stem Cells by $\gamma\delta$ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 11, p. 7287–7296, 1 jun. 2009.

TOWSTYKA, N. Y. et al. Modulation of $\gamma\delta$ T-cell activation by neutrophil elastase. *Immunology*, v. 153, n. 2, p. 225–237, fev. 2018.

VAN RHIJN, I. et al. Lipid and small-molecule display by CD1 and MR1. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 10, p. 643–654, out. 2015.

VANTOUROUT, P.; HAYDAY, A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 2, p. 88–100, fev. 2013.

VASCONCELOS, C. O. et al. Distinct Cellular Migration Induced by *Leishmania Infantum Chagasi* And Saliva From *Lutzomyia Longipalpis* in a Hemorrhagic Pool Model. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 56, n. 1, p. 21–27, jan. 2014.

VELASQUEZ, L. G. et al. Distinct courses of infection with *Leishmania (L.) amazonensis* are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice. *Parasitology*, v. 143, n. 6, p. 692–703, maio 2016.

VIDOVIĆ, D. et al. Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by a $\gamma\delta$ T-cell hybridoma. *Nature*, v. 340, n. 6235, p. 646–650, ago. 1989.

WITTE, E. et al. Interleukin-22: A cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 21, n. 5, p. 365–379, out. 2010.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Publicado em 2022.

XIE, M.-H. *et al.* Interleukin (IL)-22, a Novel Human Cytokine That Signals through the Interferon Receptor-related Proteins CRF2-4 and IL-22R. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 31335–31339, out. 2000.