

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

RENATA MONDÊGO DE OLIVEIRA

**RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE GENES DE IMUNIDADE INATA E GRAU
DE SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR DE *Leishmania infantum* EM
MACRÓFAGOS CANINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

SÃO LUÍS - MA

2016

RENATA MONDÊGO DE OLIVEIRA

**RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE GENES DE IMUNIDADE INATA E GRAU
DE SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR DE *Leishmania infantum* EM
MACRÓFAGOS CANINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Ciência Animal, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Ana Lucia Abreu Silva

Co-orientador: Prof. Renato de Lima Santos

SÃO LUÍS - MA

2016

Oliveira, Renata Mondêgo de.

Relação entre a expressão de genes de imunidade inata e grau de sobrevivência intracelular de *Leishmania infantum* em macrófagos caninos experimentalmente infectados.

55 f

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientadora: Ana Lucia Abreu Silva.

1. Cães. 2. *Leishmania infantum*. 3. Receptores do tipo Toll. 4. Receptores do tipo NOD. I. Título.

CDU: _____

RENATA MONDÊGO DE OLIVEIRA

**RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE GENES DE IMUNIDADE INATA E GRAU
DE SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR DE *Leishmania infantum* EM
MACRÓFAGOS CANINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Ciência Animal, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em: ____/____/16.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva

Universidade Estadual do Maranhão - Orientadora

Profa. Dra. Ana Patrícia de Carvalho da Silva

Universidade Federal do Tocantins - 1º membro

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo

Universidade Estadual do Maranhão - 2º membro

Aos meus pais, por serem a razão de todo meu empenho.

*“Para todo fim, um recomeço”.
Antoine de Saint-Exupéry*

“Não to mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o Senhor, teu Deus, é contigo por onde quer que andares”.

Josué 1:9

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu refúgio e minha fortaleza. Te agradeço por guiar meus pés nesta caminhada, por ter me dado forças para seguir em frente a cada dia e, nos momentos de desânimo, por ter me mostrado que eu estava no caminho certo. Agradeço ao Senhor por não ter permitido que eu desistisse. E por não ter desistido de mim.

À minha mãe, Graça Mondêgo, pelo apoio incondicional em tudo que faço, pela torcida e por compreender as minhas escolhas. Agradeço por acreditar em mim sempre.

Ao meu pai, Germano Oliveira (in memoriam), por ter me ensinado em vida o valor do trabalho, da dedicação e da determinação. Por ter me mostrado que, quando se gosta daquilo que se faz, todo esforço vale a pena. E o mais importante, por ter me ensinado a ser forte. Mesmo que eu tivesse que aprender da maneira mais difícil. Essa conquista é nossa.

Às minhas irmãs, Fabiana e Fernanda Mondêgo, pelo incentivo de uma vida inteira e por, juntamente com nossos pais, serem o alicerce que me mantém de pé todos os dias.

À minha orientadora, Profa. Ana Lucia Abreu Silva, por todas as oportunidades e pela confiança em mim depositada. Após tantos anos de convivência, fico satisfeita em ter conhecido uma grande profissional, professora e pesquisadora, mas fico ainda mais feliz por ter feito uma amiga. Obrigada por ter sido a maior incentivadora para que eu pudesse ir sempre além. Minhas conquistas sempre serão suas, e dedicadas a você.

Ao meu co-orientador, Prof. Renato de Lima Santos, por confiar a mim a realização deste trabalho, por acreditar que daria certo e por todo conhecimento partilhado.

À Profa. Tatiane Paixão, pelas sugestões para melhor execução deste trabalho e pela disponibilidade em ajudar sempre.

A todos do Laboratório de Patologia Molecular, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; pela acolhida, pela ajuda nos experimentos e agradável companhia em todos os momentos. Agradeço à Juliana Mol, Luíze Garcia, Nayara Belo, Cláudia Rocha, Luciana Fachini, Jade Farias, Kessler Was, Tatiane Carvalho, Gustavo Couto e, principalmente, aos meus queridos amigos conterrâneos Ana Patrícia de Carvalho e Auricélio Macêdo. Obrigada por tudo. Vocês são especiais!

À amiga Mayra Oliveira, pela receptividade, companheirismo e por ter feito com que me sentisse em casa em terras mineiras.

Aos amigos do Laboratório de Anatomopatologia, por todos esses anos de convivência. Agradeço a todos vocês pela amizade e por me ensinarem o real valor e a força do trabalho em equipe: Anderson, Higor, Allana, Aarão, Breno, Carol, Raquel, Douglas, Sarah, Joanna, Eslen, Alcindo, Isabel, Gustavo, Vanessa, Iara, Tatiane, Nathália, Alessandra, Natanael e Prof. Fábio. Agradeço

de modo especial à Mylena Torres, pela alegria contagiante e por ter sempre uma palavra amiga em todos os momentos. Que nós possamos ser mais como você!

À Joicy Cortez de Sá, por ser sempre o meu ponto de apoio. Muito do que aprendi devo a você, e minha gratidão não pode ser expressa em poucas linhas. Obrigada pela disponibilidade em me ajudar sempre que foi preciso, pelas inúmeras discussões frente aos resultados deste trabalho e principalmente, pela amizade, pelo carinho e palavras de incentivo.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD-NF) por possibilitar a realização do mestrado interinstitucional (UEMA/UFGM).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal e ao seu corpo docente, pelos ensinamentos e por contribuírem em mais uma etapa da minha formação profissional.

À turma 2014-2016, de modo especial à Karoline Gonçalves, Thayane Fernandes, Almerinda Medeiros, Italla Mayara, Luciana Rosa, Carla Janaína, Paulo Bryguel, Delano Alencar, Emerson Araújo, Danilo Brenno e o “agregado” Douglas Dadalto, nossa “Sala da Justiça”. Obrigada por todas as sociais e por tornarem esses dois anos de mestrado mais prazerosos e divertidos, mesmo nos momentos mais difíceis.

À grande amiga e parceira desse mestrado, Isadora Magalhães. Fica aqui a certeza de duas coisas: de que tudo teria sido diferente se não tivesse passado por esta experiência contigo, e de que todas as alegrias foram mais intensas e as tristezas mais amenas porque tive alguém com quem pude contar, em todos os momentos, longe ou perto. Te agradeço por ser minha companhia constante, pelas conversas, pelos cafés, pela cumplicidade e pelo profissionalismo sem medida, que só fez com que te admirasse ainda mais.

Aos grandes amigos Venir Lia, Izaías Polary, Deborah Cristina, Jessica Stefane, Isabelle Lima e Fabiana Lima, que foram os sorrisos, abraços e conversas que me animaram em todos os momentos.

Obrigada!

RESUMO

A leishmaniose visceral canina é uma importante zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, transmitida pela picada de insetos flebotomíneos. Apesar do avanço no conhecimento dos mecanismos imunológicos frente à infecção por *Leishmania* nos últimos anos, há poucos estudos sobre o estabelecimento da resposta imune em cães, especialmente sobre os mecanismos de imunidade inata. Nesse contexto, visando medidas futuras de controle dos casos caninos e humanos, a imunoterapia desponta como uma opção viável. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi determinar o perfil de expressão gênica dos receptores TLR9, NOD1 e NOD2 e avaliar sua correlação com a sobrevivência intracelular de *L. infantum* em macrófagos caninos. Após exames de triagem e confirmação de diagnóstico negativo para a doença, foram selecionados 43 animais clinicamente saudáveis para coleta de sangue para cultivo celular. Após diferenciação de monócitos em macrófagos, parte do sobrenadante da cultura foi coletado e armazenado a -80°C para posterior extração de RNA e realização de PCR em tempo real, para avaliação da expressão dos genes de imunidade inata. A outra parte foi experimentalmente infectada por *L. infantum*, com posterior avaliação da sobrevivência intracelular do parasito. Observou-se que a expressão desses genes é baixa, além de correlação positiva entre a expressão de NOD2 e a sobrevivência intracelular de *L. infantum*. Esses resultados evidenciam a importância de estudos que visem descrever, de forma mais aprofundada, a função destes e de outros receptores, tanto na infecção experimental como em animais naturalmente infectados.

Palavras-chave: cães, *Leishmania infantum*, receptores do tipo Toll, receptores do tipo NOD.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis is an important zoonosis caused by *Leishmania infantum*, transmitted by sand flies. Despite the advance in the understanding of the immune mechanisms against *Leishmania* infection in recent years, there are few studies about the establishment of the immune response in dogs, especially on the mechanisms of innate immunity. In this context, aiming future control measures of canine and human cases, immunotherapy has emerged as a viable option. This way, the aim of this study was to determine the gene expression of the receptors TLR9, NOD1 and NOD2 in canine macrophages and evaluate their correlation with the intracellular survival of *L. infantum*. After screening tests and confirmation of negative diagnosis for the disease, 43 clinically healthy animals were selected for blood collection for cell culture. After monocytes differentiation into macrophages, part of the culture supernatant was collected and stored at -80°C for subsequent RNA extraction and real-time PCR, for evaluation of the expression of innate immunity genes. The other part was experimentally infected with *L. infantum*, with further evaluation of the intracellular survival of the parasite. It was observed the low expression of these receptors and a positive correlation between the expression of NOD2 and intracellular survival of *L. infantum*. These results highlight the importance of studies that aim to describe, in a more detailed manner, the function of these and other receptors, both in experimental infection as in naturally infected animals.

Keywords: dogs, *Leishmania infantum*, NOD-like receptors, Toll-like receptors.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema simplificado das vias de sinalização dos TLR.	25
Figura 2 - Organização estrutural dos receptores do tipo NOD.	26

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1 - Estudo de correlação de Pearson entre a expressão gênica de TLR9 e sobrevivência intracelular de <i>Leishmania infantum</i> em macrófagos caninos.	37
Gráfico 2 - Estudo de correlação de Pearson entre a expressão gênica de NOD1 e sobrevivência intracelular de <i>Leishmania infantum</i> em macrófagos caninos.	38
Gráfico 3 - Estudo de correlação de Pearson entre a expressão gênica de NOD2 e sobrevivência intracelular de <i>Leishmania infantum</i> em macrófagos caninos.	39

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Receptores do tipo Toll e seus respectivos PAMPs

23

Tabela 2 - Lista de genes e primers utilizados na qPCR

36

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	por cento
°C	graus Celsius
293T	linhagem de células embrionárias de rim humano
AP1	proteína ativadora 1
ASC	proteína adaptadora associada a apoptose contendo um domínio CARD
BALB/c	camundongos da linhagem Balb/c
BIR	domínio de repetição inibitória de baculovirus
C57BL/6	camundongos da linhagem <i>Black six</i>
CARD	domínio de ativação e recrutamento de caspases
cDNA	DNA complementar
CIITA	transativador classe II
CLR	receptores de lectina tipo C
CO ₂	dióxido de carbono
CpG-DNA	regiões de DNA em que citosina ocorre ao lado de guanina
CT	ciclo limiar
DAMP	padrão molecular associado ao perigo
DEPC	dicarbonato de dietila
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	trifosfato de desoxiribonucleotídeos
ELISA	ensaio imunoenzimático
g	giros
IKK	IκB quinase
IKKβ	inibidor da quinase-κBβ
IKKε	inibidor da quinase-κBε
IL	interleucina
INFβ	interferon beta
INFγ	interferon gama
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
IRAK4	proteína quinase 4 associada ao receptor de interleucina 1
IRF3	fator de regulação de interferon 3
IκB	inibidor de κB
LC	leishmaniose cutânea
LCD	leishmaniose cutânea difusa

LMC	leishmaniose mucocutânea
LPG	lipofosfoglicano
LPS	lipopolissacarídeo
LRR	repetições ricas em leucina
LV	leishmaniose visceral
LVC	leishmaniose visceral canina
MA	Maranhão
MAPK	proteína quinase associada ao mitógeno
MG	Minas Gerais
MgCl₂	cloreto de magnésio
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
mL	mililitros
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
MyD88	proteína do fator de diferenciação mielóide 88
NAIP	proteínas inibidoras de apoptose neuronal
NEMO	modulador essencial de NFκB
NFκB	fator nuclear κB
ng/μL	nanograma por microlitro
NK	<i>natural killer</i>
NLR	receptores do tipo NOD
NLRA	receptores do tipo NOD expressando o domínio de transativação de ácido
NLRB	receptores do tipo NOD expressando o domínio BYR
NLRC	receptores do tipo NOD expressando o domínio CARD
NLRP	receptores do tipo NOD expressando o domínio de pirina
NO	óxido nítrico
NOD	domínio de oligomerização de nucleotídeos
p/v	massa/volume
PAMP	padrão molecular associado a patógenos
PBMC	células mononucleares do sangue periférico
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação da cadeia de polimerase
PI	Piauí

PRR	receptores de reconhecimento de padrões
PYR	domínio de pirina
qPCR	PCR quantitativa ou PCR em tempo real
RIG-I	gene 1 induzível por ácido retinóico
RIP1	proteína 1 de interação com o receptor
RIP3	proteína 3 de interação com o receptor
RIPK2	proteína quinase 2 de interação com o receptor
Rk39	antígeno recombinante K39
RLR	receptores do tipo RIG-I
RN	Rio Grande do Norte
RNA	ácido ribonucleico
RPMI	meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	soro fetal bovino
SP	São Paulo
spp	espécies
TAK1	quinase 1 ativada por TGF β
TANK	membro da família TRAF associado ao ativador de NF κ B
TBK1	quinase ligadora de TANK
Th	linfócito T helper
TIR	receptor Toll/Interleucina 1
TIRAP	domínio TIR contendo proteína adaptadora
TLR	receptores do tipo Toll
TNFα	fator de necrose tumoral alfa
TO	Tocantins
TRADD	receptor 1 de TNF associado ao domínio de morte
TRAF3	receptor de TNF associado ao fator 3
TRAF6	receptor de TNF associado ao fator 6
TRAM	molécula adaptadora relacionada ao TRIF
TRIF	domínio TIR contendo proteína adaptadora indutora de IFN β
UI	unidade internacional
μg	microgramas
μL	microlitros
μM	micromolar

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Leishmaniose	19
2.2 O sistema imune inato e os receptores de reconhecimento de padrões	21
2.2.1 Receptores do tipo Toll	22
2.2.1.1 Vias de sinalização dos TLRs	23
2.2.2 Receptores do tipo NOD	25
2.2.2.1 Vias de sinalização dos NLRs	27
2.3 TLRs e leishmaniose	28
2.4 NLRs e leishmaniose	29
3 HIPÓTESE	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 Geral	32
4.2 Específicos	32
5 MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 Seleção dos animais e obtenção de amostras	33
5.2. Cultivo celular	33
5.3 Avaliação da viabilidade celular	34
5.4 Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos caninos por <i>L. infantum</i>	34

5.5 Extração de RNA	35
5.6 Confecção de cDNA	35
5.7 Quantificação de mRNA de genes de imunidade inata através de qPCR	36
5.8 Análise estatística	36
6 RESULTADOS	37
7 DISCUSSÃO	40
8 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa negligenciada, que afeta principalmente populações mais pobres e marginalizadas, constituindo um grave problema de saúde pública, com significativa mortalidade e morbidade (TUON et al., 2008). A doença apresenta diversas formas clínicas, e está amplamente distribuída em mais de 98 países da África, das Américas, Ásia e Europa (ALVAR et al., 2012).

Do ponto de vista biológico, as espécies de *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios que parasitam principalmente os macrófagos do hospedeiro. Desde a inoculação das formas promastigotas na pele do hospedeiro pelo inseto vetor até a diferenciação em amastigotas no interior das células-alvo, o estabelecimento ou não da enfermidade depende da habilidade do parasito em evadir-se da resposta imunológica do hospedeiro, que inclui elementos da defesa inata e adaptativa (GUPTA et al., 2013).

A via de sinalização dos receptores do tipo Toll (TLR) é uma das primeiras barreiras de defesa contra microrganismos invasores (ODA E KITANO, 2006). Os TLRs são proteínas transmembranas que reconhecem várias categorias de agentes patogênicos. A família dos TLRs é composta por 10 membros em seres humanos e 12 em camundongos, com especificidade para diferentes patógenos (JANSSENS E BEYAERT, 2003).

Por outro lado, os receptores semelhantes à NOD (NLR) são uma família adicional de receptores da resposta imune inata, que também reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) no citoplasma das células, o que sugere que, quando microrganismos escapam da vigilância extracelular, existe outra linha de reconhecimento nas células do hospedeiro. Dentre os mais de 20 NLRs estão o NOD1 e o NOD2, que reconhecem peptídeoglicanos da parede celular bacteriana (KANNEGANTI et al., 2007).

Os TLRs, importantes em outras doenças, já foram investigados na leishmaniose (KROPF et al., 2004a; LIESE et al., 2007; KAVOOSI et al., 2009; SAFAIYAN et al., 2011), mas informações sobre seu papel no hospedeiro canino são escassas, bem como o papel desempenhado pelos NLRs.

Sob o aspecto epidemiológico, a leishmaniose visceral (LV) é endêmica no Brasil, com registro frequente de surtos, que atingem as cinco regiões brasileiras (BRASIL, 2010). Casos autóctones de LV já foram registrados em 26 dos 27 estados, indicando a dispersão da doença ao longo do território brasileiro (SINAN, 2013).

Na década de 90, aproximadamente 95% dos casos da doença estavam concentrados na região Nordeste, especialmente nas capitais Teresina (PI), São Luís (MA) e Natal (RN), mas, em decorrência da sua ampla expansão para cidades de outras regiões, como Belo Horizonte (MG), Araguaína (TO), Campo Grande (MS), Bauru (SP), Palmas (TO), Cametá (PA), Rondonópolis (MT), Três Lagoas (MS), Montes Claros (MG) e Araçatuba (SP), a partir do ano 2000 essa proporção diminuiu para aproximadamente 50%, mantendo-se estável desde então. Esses dados evidenciam a urbanização da LV e demonstram que não há sinais evidentes de que a sua transmissão esteja sob controle (WERNECK, 2014).

O estudo da leishmaniose visceral canina (LVC) sob o ponto de vista clínico e epidemiológico é muito importante, uma vez que o cão é incriminado como principal reservatório do parasito. Por esse motivo, as medidas de controle da doença são pautadas principalmente na eliminação de animais sororreagentes. No entanto, a análise de dados da ocorrência de LV nas últimas décadas demonstra que a eutanásia de cães positivos não reduziu o número de casos humanos, o que mostra que não há um real impacto dessa medida no controle da doença.

O aumento crescente da casuística da doença canina e humana no Brasil, a baixa aceitação da eutanásia como principal medida preventiva, dada a importância do cão no ambiente familiar; e a inexistência de práticas de controle e prevenção da doença a longo prazo torna necessária a busca por outras alternativas que impeçam a expansão da LV. Nesse contexto, visando medidas futuras de controle dos casos caninos e humanos, a imunoterapia desponta como uma opção viável, tendo em vista a necessidade de uma investigação mais aprofundada dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença e no estabelecimento de uma resposta imunológica protetora. Estudos experimentais já evidenciaram a importância dos receptores de reconhecimento de padrões como adjuvantes de vacinas e na imunoterapia contra a leishmaniose. O papel TLRs e NLRs já foi documentado em várias doenças em cães, portanto faz-se necessário investigar seu papel na imunidade inata frente à infecção por *Leishmania infantum*, justificando-se desta maneira a realização desta pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose

Os parasitos do gênero *Leishmania* são responsáveis pela leishmaniose, um complexo de doenças que afetam o homem e várias populações animais. Mais de 30 espécies já foram identificadas até o momento e destas, aproximadamente 10 são de importância médica e veterinária (BATES, 2007). Tanto a leishmaniose humana quanto a canina são consideradas doenças negligenciadas, e são endêmicas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, como a Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e o Brasil (DESJEUX, 2004).

Independente da espécie de *Leishmania*, o ciclo biológico é digenético, alternando entre um hospedeiro mamífero e insetos vetores, que podem ser do gênero *Phlebotomus* spp. e *Lutzomyia* spp. O ciclo começa quando o flebótomo fêmea infectado realiza seu repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado e inocula na pele deste as formas infectivas, promastigotas metacíclicas, as quais são fagocitadas pelos macrófagos e se transformam em formas amastigotas, que se reproduzem por meio de divisão binária. As amastigotas se dividem, aumentando em quantidade até que a célula se rompa, e são novamente fagocitadas por novas células, dando continuidade ao ciclo (BAÑULS et al., 2007).

A leishmaniose possui um amplo espectro de manifestações clínicas, que podem variar desde lesões cutâneas brandas até a forma sistêmica, mais grave. A doença pode ser classificada em quatro quadros clínicos principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV), que diferem entre si quanto aos aspectos imunopatológicos e graus de morbidade e mortalidade (KEDZIERSKI, 2011; KHEIRANDISH et al., 2013).

A LV, ou calazar, é a forma sistêmica da enfermidade, potencialmente fatal caso não tratada. Em seres humanos, pode ser caracterizada clinicamente por febre prolongada, perda gradativa de peso, hepatoesplenomegalia, anemia progressiva, hipergamaglobulinemia e pancitopenia (SUNDAR E RAI, 2002). A maioria dos casos ocorre em áreas onde as condições socioeconômicas são precárias (WHO, 2015).

A leishmaniose visceral canina (LVC), por sua vez, é considerada mais importante que a doença no homem, visto que o cão tem sido incriminado como principal reservatório da infecção (DANTAS-TORRES E BRANDÃO-FILHO, 2006); embora outras espécies

domésticas, como o gato (DE SOUZA et al., 2005; DA SILVA et al., 2008) e sinantrópicas, como a raposa (SILVA et al., 2000; TENÓRIO et al., 2011), marsupiais (SCHALLIG et al., 2007) e roedores (OLIVEIRA et al., 2005) também desempenhem esse papel.

No Brasil, a LVC era considerada endêmica apenas nas áreas rurais, mas desde a década de 80 vem se expandindo para os centros urbanos (HARHAY et al., 2011). Os grandes índices de desmatamento, com consequente adaptação do flebotomíneo ao ambiente urbano, e a intensa migração de pessoas e animais das zonas rurais para as cidades são fatores que contribuíram para a urbanização da doença (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; BARRETO et al., 2011).

L. infantum (= *L. chagasi*) é a espécie mais comumente associada à forma visceral da doença em cães (CHAPPUIS et al., 2007). Os animais infectados podem permanecer assintomáticos ou manifestar sinais clínicos variáveis, como febre, perda de peso leve a moderada, caquexia, alterações dermatológicas (pelagem opaca, alopecia, onicogribose, úlceras na pele, focinho e orelhas), opacidade da córnea, ceratoconjuntivite, febre, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, epistaxe, poliúria, polidipsia e complicações nervosas (MONTEIRO et al., 2009; PENAFORTE et al., 2013).

Alguns fatores, como a resposta imunológica do hospedeiro e a constituição gênica do parasito podem influenciar diretamente na manifestação clínica e no prognóstico da enfermidade. Também é possível que possam contribuir para a persistência do parasito no hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2013).

Em cães, o principal mecanismo efetor envolvido na imunidade protetora é a ativação de macrófagos pelas citocinas do perfil Th1, principalmente interferon gama ($INF\gamma$) e fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$). Estas estimulam a produção da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), responsável por catalisar o aminoácido L-arginina em óxido nítrico (NO), uma molécula tóxica que desempenha um importante papel microbicida (HOLZMULLER et al., 2005). O desenvolvimento da doença geralmente é relacionado com o aumento da carga parasitária e uma resposta humoral forte, mas ineficiente (SOLANO-GALLEG0 et al., 2009). Embora a imunidade adaptativa seja essencial na resolução da infecção, os mecanismos da imunidade inata são de grande importância na defesa antiparasitária (FARIA et al., 2012).

2.2 O sistema imune inato e os receptores de reconhecimento de padrões

O sistema imunológico pode ser subdividido em sistema imune inato e sistema imune adaptativo. A resposta imune inata era inicialmente considerada como não específica e menos complexa, no entanto essa ideia foi reformulada com a descoberta do primeiro receptor do tipo Toll em seres humanos, nos anos 90 (MEDZHITOV et al., 1997). A partir de então, houve maior compreensão dos papéis da imunidade inata no reconhecimento de patógenos, na sua eliminação e no processo inflamatório, anteriormente subestimados (PANDEY et al., 2014).

Esse reconhecimento é feito por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que identificam estruturas conservadas de microrganismos, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e moléculas derivadas de células danificadas do próprio organismo, conhecidas como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) (KAWASAKI E KAWAI, 2014). Estes ativam a expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), moléculas co-estimuladoras e mediadores inflamatórios, por células do sistema imune, como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e outros fagócitos “não profissionais” (PANDEY et al., 2014).

Esses processos não apenas desencadeiam os mecanismos imediatos do início da resposta imune, mas também iniciam e orquestram a resposta imune adaptativa antígeno-específica (SURESH E MOSSER, 2013).

Microrganismos como bactérias, vírus, fungos e parasitos possuem uma ampla variedade de PAMPs, necessários à sua sobrevivência. Os PAMPs variam quanto à sua natureza molecular, podendo ser lipídios, lipoproteínas, proteínas e ácidos nucleicos, detectados por receptores específicos (AKIRA et al., 2006).

Os PRRs são agrupados em diversas classes, dependendo das suas semelhanças estruturais. Podem ser receptores do tipo Toll (TLRs), do tipo NOD (NLRs), do tipo RIG-I (RLRs), receptores de lectina tipo C (CLRs) e sensores citosólicos de DNA (TANG et al., 2012).

2.2.1 Receptores do tipo Toll

A descoberta da família dos TLRs deu-se a partir da identificação de um *toll*, um receptor expresso em *Drosophila melanogaster*, essencial na embriogênese e no estabelecimento da resposta imune inata frente à infecção por fungos (LEMAITRE et al., 1996).

Os TLRs, por terem sido os primeiros receptores a serem identificados, são melhor caracterizados. São proteínas transmembrânicas do tipo I, formados por três domínios: extracelular, transmembranar e citoplasmático (KAWAI E AKIRA, 2011). O domínio extracelular é constituído por repetições ricas em leucina (LRRs), que formam um arranjo helicoidal semelhante a uma ferradura; e é responsável pelo reconhecimento e ligação dos PAMPs. O domínio transmembranar é curto e serve como ligação entre o meio extra e intracelular. O domínio citoplasmático, denominado receptor Toll/IL-1 (TIR), interage com proteínas adaptadoras que iniciam as vias de sinalização, culminando na regulação da expressão de citocinas, quimiocinas e interferons do tipo I, que atuam na defesa do hospedeiro contra infecções microbianas (BOTOS et al., 2011).

Até o momento foram identificados 10 TLRs distintos em humanos (TLR1-10) e 12 em camundongos (TLR1-9, TLR11-13), que podem funcionar como homo ou heterodímeros. São classificados em dois grupos, com base na localização celular e nos PAMPs que reconhecem (Tabela 1). TLR1, 2, 4, 5, 6 e 10 estão presentes na superfície celular e reconhecem lipídios, lipoproteínas e proteínas; enquanto TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 e 13 são encontrados em compartimentos intracelulares, como os endossomos, onde reconhecem ácidos nucléicos provenientes de microrganismos ou, em condições particulares como doenças autoimunes, ácidos nucléicos originários do próprio organismo (BLASIUS E BEUTLER, 2010; KAWAI E AKIRA, 2010; CELHAR et al., 2012).

Tabela 1 - Receptores do tipo Toll e seus respectivos PAMPs

Receptor	PAMPs reconhecidos	Microrganismos	Localização
TLR1	Lipopeptídeos triacetilados	Bactérias	Superfície celular
TLR2	Lipopeptídeos di/triacetilados	Bactérias	Superfície celular
TLR3	RNA de fita dupla	Vírus	Endossomos
TLR4	LPS	Bactérias	Superfície celular
TLR5	Flagelina	Bactérias	Superfície celular
TLR6	Lipopeptídeos diacetilados	Micobactérias	Superfície celular
TLR7	RNA de fita simples	Vírus/bactérias	Endossomos
TLR8	RNA de fita simples	Vírus/bactérias	Endossomos
TLR9	CpG-DNA metilados	Vírus/bactérias	Endossomos
TLR10	Desconhecido	Desconhecido	Superfície celular
TLR11	Flagelina, profilina	Bactérias/protozoário	Endossomos
TLR12	Profilina	Protozoários	Endossomos
TLR13	RNAr 23S	Bactérias	Endossomos

Fonte: adaptado de Kawasaki e Kawai (2014) e Pandey et al. (2014).

A ativação das vias de sinalização dos TLRs inicia-se com o recrutamento de uma ou mais proteínas adaptadoras, tais como: MyD88 (proteína do fator de diferenciação mielóide 88), TIRAP (domínio TIR contendo proteína adaptadora), TRIF (domínio TIR contendo proteína adaptadora indutora de IFN β) e TRAM (molécula adaptadora relacionada ao TRIF). A via dependente de MyD88 é utilizada por todos os TLRs, com exceção do TLR3, que emprega uma via alternativa, dependente do TRIF. Já o TLR4 ativa ambas as vias (Figura 1) (BARTON E KAGAN, 2009).

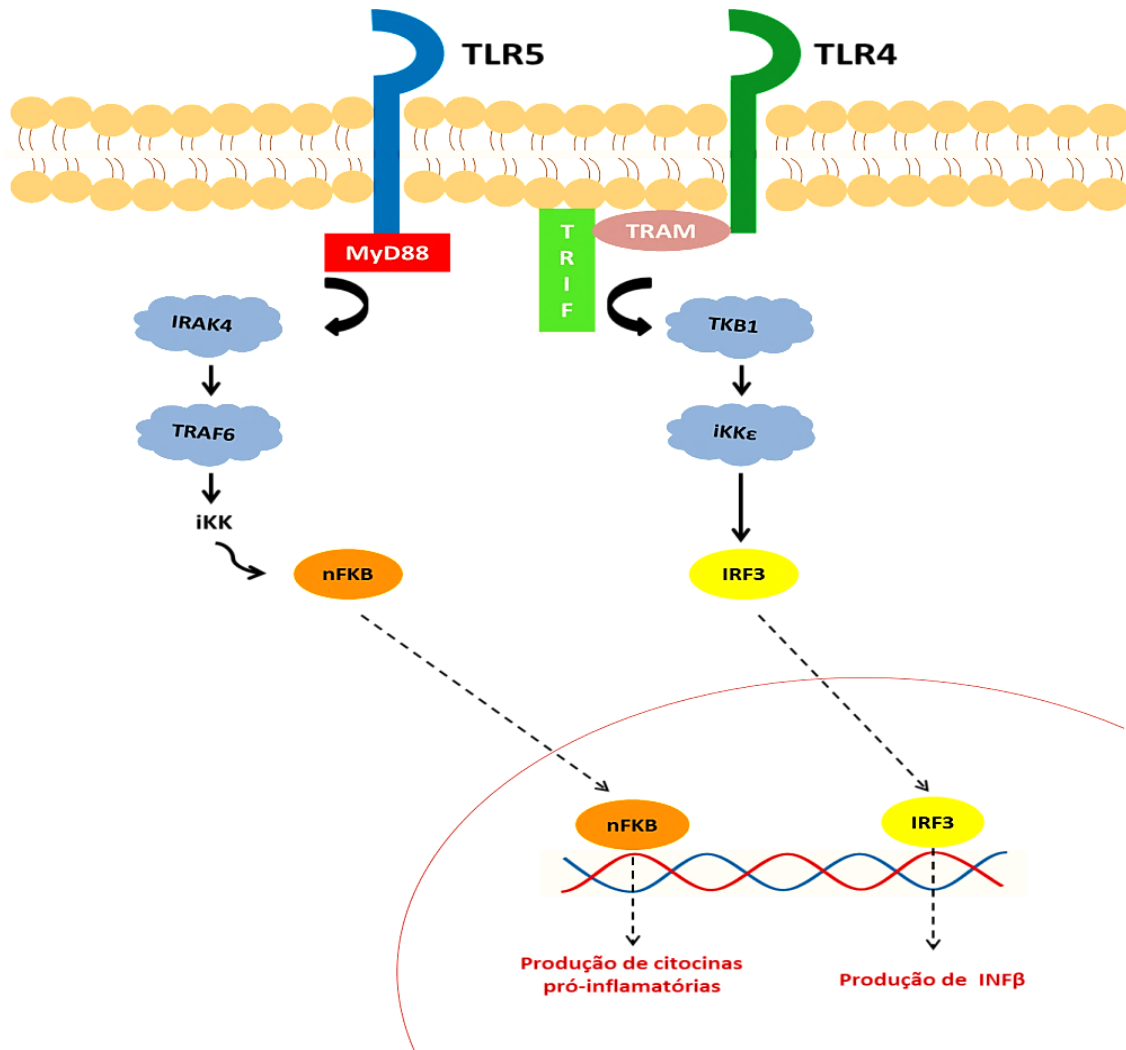
2.2.1.1 Vias de sinalização dos TLRs

Na via MyD88-dependente, após a ligação da proteína adaptadora ao domínio intracelular do TLR em questão, há o recrutamento da proteína quinase 4 associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK4) que, após fosforilação, ativa a proteína TRAF6 (receptor de TNF associado ao fator 6), desencadeando o aumento da atividade do complexo enzimático I κ B quinase (IKK). A fosforilação desse complexo resulta na translocação do fator nuclear κ B (NF κ B) para o núcleo da célula, induzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TAKEDA E AKIRA, 2005).

Já na via TRIF-dependente, o adaptador associa-se às proteínas TRAF3, TRAF6, RIP1 e RIP3 (proteínas 1 e 3 de interação com o receptor). A interação entre TRAF6 e RIP1 com as quinases TRADD (Receptor 1 de TNF associado ao domínio de morte) e TAK1 (quinase 1 ativada por TGF β) induzem a produção de citocinas inflamatórias, através da ativação de MAPKs (proteína quinase associada ao mitógeno) e do NF κ B (ERMOLAEVA et al., 2008). Por outro lado, a combinação das proteínas TRAF3, TBK1 (quinase ligadora de TANK) e IKK ϵ (Inibidor da quinase- κ B ϵ) acarreta na fosforilação e ativação do IRF3 (fator de regulação de interferon 3), com consequente produção de INF β (FITZGERALD et al., 2003).

O TLR4 também utiliza a via do TRIF, no entanto, para que o mecanismo de sinalização funcione de forma adequada, é necessário o recrutamento de uma segunda molécula adaptadora, TRAM (BLASIUS E BEUTLER, 2010). De modo geral, este receptor comporta-se de maneira diferenciada em relação aos demais TLRs: é o único capaz de ativar as duas vias de sinalização, de recrutar todas as proteínas adaptadoras e, apesar da sua localização na superfície celular, consegue induzir a formação de interferon tipo 1, restrita aos receptores encontrados nos compartimentos intracelulares (BARTON E MEDZHITOV, 2003; O'NEILL E BOWIE, 2007).

Figura 1 - Esquema simplificado das vias de sinalização dos TLR.



Fonte: A autora (2016)

2.2.2 Receptores do tipo NOD

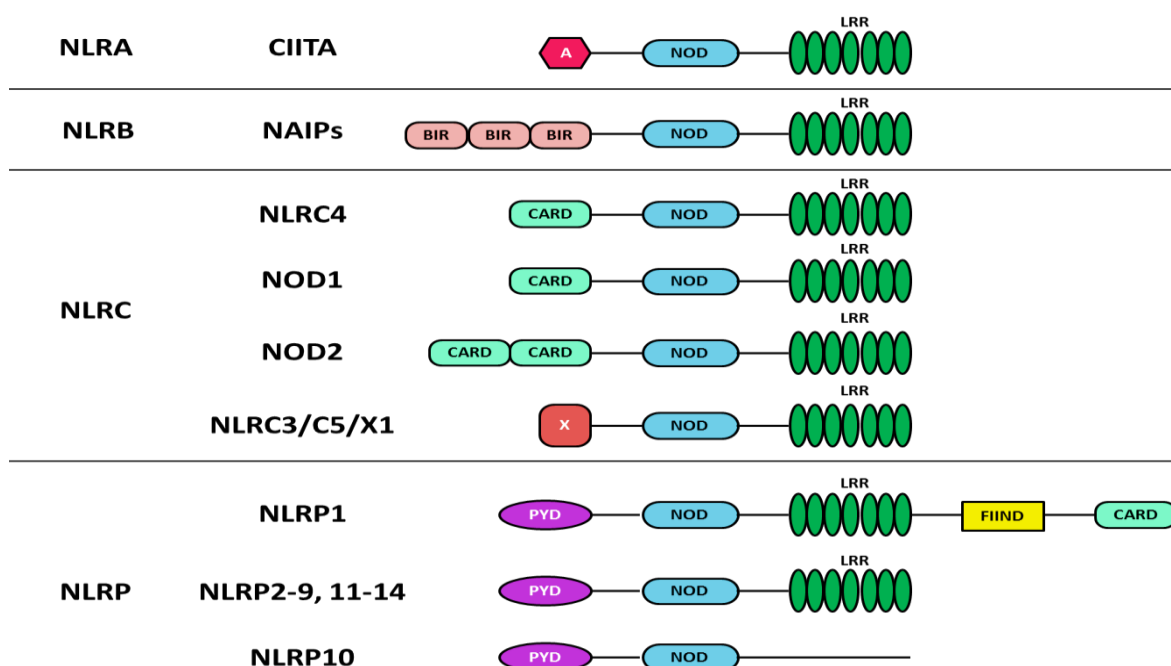
Os receptores do tipo NOD (domínio de oligomerização de nucleotídeos), ou NLRs, são proteínas citoplasmáticas sensores de PAMPs. Foram descritos pela primeira vez como componentes do sistema imune inato de plantas, desempenhando papel na proteção contra doenças, através da ativação do gene R (JONES E DANGL, 2006). Formas homólogas desse receptor são encontradas em vertebrados e em organismos mais primitivos, como o ouriço-do-mar, que possui pelo menos 203 NLRs (HIBINO et al., 2006). A conservação dos receptores ao longo do processo evolutivo demonstra sua importância para a defesa do hospedeiro (FRANCHI et al., 2009).

Já foram relatados 22 tipos de NLRs em humanos e pelo menos 34 em camundongos, expressos em uma variedade de tipos celulares, como células epiteliais, neutrófilos e macrófagos (INOHARA E NUÑEZ, 2003; KANNEGANTI et al., 2007).

Estruturalmente, os NLRs são compostos por um domínio NOD central, um domínio carboxi-terminal e um domínio efetor amino-terminal variável (Figura 2). O domínio central é responsável pela capacidade de oligomerização dos receptores, com consequente ativação destes. O domínio carboxi-terminal, rico em LRRs, é responsável pela detecção dos PAMPs e DAMPs. Já o domínio efetor amino-terminal medeia o início da cascata de sinalização, através de sua interação com proteínas adaptadoras. Esse domínio pode ser um domínio de transativação de ácido, domínio de repetição inibitória de baculovírus (BIR), domínio de ativação e recrutamento de caspases (CARD) ou um domínio de pirina (PYR) (TING et al., 2008; FRANCHI et al., 2009).

Dependendo do tipo de domínio efetor presente, os NLRs podem ser classificados em 4 famílias distintas: NLRA ou CIITA (transativador classe II), NLRB ou NAIP (proteínas inibitórias de apoptose neuronal), NLRC e NLRP, que possuem os domínios de transativação de ácido, BIR, CARD e PYR, respectivamente (ZHONG et al., 2013).

Figura 2 - Organização estrutural dos receptores do tipo NOD.



Fonte: Adaptado de Zhong et al. (2013)

2.2.2.1 Vias de sinalização dos NLRs

A ativação das vias de sinalização dos NLRs pode resultar em três eventos distintos: a ativação de fatores transcricionais, a ativação do NF κ B e a formação de inflamassomos, os dois últimos resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (MOTTA et al., 2015). Inflamassomos são complexos multiprotéicos formados no citoplasma das células após estímulo por moléculas endógenas ou de patógenos, e são constituídos por um NLR, uma proteína adaptadora ASC (proteína adaptadora associada a apoptose contendo um domínio CARD) e a forma ativa da caspase-1 (MARTINON et al., 2002).

Os receptores NOD1 e NOD2 promovem a ativação do NF κ B em consequência da detecção citosólica de fragmentos de peptidoglicanos bacterianos (PHILPOTT et al., 2014). Ao reconhecer um PAMP ou DAMP, iniciam o processo de oligomerização do seu domínio central, que acarreta na exposição do domínio CARD e recrutamento da proteína RIPK2 (proteína quinase 2 de interação com o receptor), que envia sinais para os receptores via interação CARD-CARD (LECINE et al., 2007). A ubiquitinação de RIPK2 leva à liberação do modulador essencial de NF κ B (NEMO) e, desta forma, à ativação do complexo IKK. Após fosforilação da porção IKK β do complexo, há a liberação de NF κ B, que é translocado para o núcleo da célula, onde induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias (HASEGAWA et al., 2006). Além da ativação do NF κ B, RIPK2 também ativa a via MAPK, resultando na liberação do fator de transcrição AP1, responsável pelo controle da proliferação e diferenciação celular e da apoptose (KOBAYASHI et al., 2005).

Já os inflamassomos, após reconhecer a estrutura da molécula ligante, recrutam a proteína caspase-1, necessária para a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 e na indução de uma morte celular programada chamada piroptose, que restringe a replicação do patógeno (LIU et al., 2013; LAMKANFI E DIXIT, 2014).

Por último, o receptor CIITA funciona como co-ativador transcricional fundamental para expressão do MHC tipo II em células apresentadoras de antígeno. Embora possua a mesma conformação estrutural dos demais NLRs, esse receptor possui um domínio ácido adicional e um domínio rico em prolina, serina e treonina no seu terminal N. As alterações estruturais de CIITA não permitem sua ligação com DNA, mas fornecem uma plataforma para recrutamento e interação de proteínas necessárias à transcrição do MHC II em linfócitos,

células dendríticas, macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno, através do estímulo com INF γ (MASTERNAK et al., 2000; BERESFORD E BOSS, 2001).

2.3 TLRs e leishmaniose

Na fase inicial da infecção, a habilidade das espécies de *Leishmania* em invadir e sobreviver ao ambiente hostil presente no interior dos macrófagos depende da interação entre as moléculas da superfície celular e do parasito. Na leishmaniose, o comprometimento da resposta imune do hospedeiro, com diminuição da resposta efetora dos macrófagos e aumento da secreção de citocinas do perfil Th2 endossa a importância da ativação de outros mecanismos de reconhecimento do patógeno, especialmente a via dos TLRs (SINGH et al., 2012).

A infecção *in vitro* de macrófagos com *L. donovani* comprovou o envolvimento dos receptores TLR2 e TLR3 na produção de TNF α e óxido nítrico, ambos importantes para a resolução da infecção e estabelecimento da imunidade protetora contra *Leishmania* (FLANDIN et al., 2006). Além disso, estudos de transfecção de células 293T com vários TLRs demonstraram que TLR2 é o principal receptor de lipofosfoglicanos (LPG), presentes na superfície do parasito (DE VEER et al., 2003).

Estudos com neutrófilos humanos sugerem que TLR2 se liga diretamente ao LPG, desencadeando os eventos de sinalização (BECKER et al., 2003). Recentemente, foi demonstrado que o anticorpo anti-TLR2 é capaz de inibir tais eventos, entretanto, mesmo cepas de *L. donovani knockout* para LPG ainda são capazes de ativar macrófagos de modo dependente de TLR2, sugerindo que este receptor também reconhece outras frações de fosfoglicanos de *Leishmania* (SRIVASTAV et al., 2012).

Glicoproteínas e esfingofosfolípídeos presentes na superfície de *L. donovani* foram apontadas como potenciais ligantes para TLR4, com base na sua capacidade em induzir moléculas efetoras, tais como espécies reativas de oxigênio e IL-12 (KARMAKAR et al., 2012, PAUL et al., 2012). Em consonância com esses dados, camundongos *knockout* para o gene TLR4 são altamente suscetíveis à infecção por *Leishmania* spp., por isso apresentam uma alta carga parasitária. Apesar disso, curiosamente estes animais são capazes de, em última instância, eliminar a infecção parasitária, o que sugere assim a ação de outros TLRs (KROPF et al., 2004a, KROPF et al., 2004b).

Dentre estes, TLR9 desponta como outro importante receptor envolvido na proteção contra *Leishmania*. Ao reconhecer o DNA do parasito, promove o aumento da síntese de IL-12 e a lise de células-alvo específicas, através da ativação de células *natural killers* (NK) (LIESE et al., 2007, SCHLEICHER et al., 2007). Além disso, camundongos *knockout* são mais suscetíveis à infecção, mas, de forma semelhante ao que ocorre com animais *knockout* para TLR4, eventualmente ocorre a resolução da doença com o passar do tempo. Estes estudos independentes destacam a redundância quanto aos papéis dos diversos TLRs frente à infecção (LIESE et al., 2007, WEINKOPFF et al., 2013).

A detecção de ácidos nucléicos de *Leishmania* spp. por TLRs endossomais é outro importante fator de resistência à infecção. Estudos mostram que no modelo murino a deficiência de um destes receptores: TLR3, TLR7 ou TLR9 resultam em susceptibilidade moderada à doença, enquanto que a deficiência simultânea dos três receptores tornou os animais altamente suscetíveis. Esses resultados demonstram mais uma vez que diferentes TLRs podem desempenhar a mesma função no organismo humano ou animal. Também foi observado que o papel de TLR5 na promoção de resposta imune ainda é desconhecido (SCHAMBER-REIS et al., 2013).

Em seres humanos e camundongos, a função dos TLR na leishmaniose é bem estabelecida, inclusive com ensaios laboratoriais para fins terapêuticos e vacinais (RAMAN et al., 2010). Entretanto, estudos reportando suas funções em cães são extremamente escassos.

2.4 NLRs e leishmaniose

Apesar do papel dos NLRs na resposta imune inata contra *Leishmania* já ter sido descrito por alguns autores (LIMA-JUNIOR et al., 2013; GURUNG et al., 2015a; GURUNG et al., 2015b; TURCHETTI et al., 2015), os dados disponíveis na literatura são escassos, e limitados aos receptores NLRP3, NOD1 e NOD2.

O inflamassomo NLRP3 é um dos maiores reguladores da produção das citocinas IL-1 β e IL-18, *in vitro* e *in vivo* (GURUNG et al., 2015a). Em estudos realizados por Lima-Junior et al. (2013) foi evidenciado o papel protetor de NLRP3 durante a infecção de camundongos resistentes da linhagem C57BL/6 por *L. amazonensis*. Os experimentos *in vitro* mostraram que algumas espécies de *Leishmania*, como *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* induzem a ativação de caspase-1 e a produção de IL-1 β dependente de NLRP3. Além disso, demonstrou que camundongos *knockout* para os genes NLRP3, ASC e caspase-1

são altamente suscetíveis à infecção por *L. amazonensis* quando comparados a animais normais, demonstrando a importância do inflamassomo na promoção de uma resposta protetora à infecção nesta linhagem.

Quanto ao mecanismo de ação, IL-1 β induz a produção de óxido nítrico, promovendo a destruição do parasito no interior dos macrófagos. Um estudo mais recente mostra a importância do NLRP3 durante a infecção por *L. major* em camundongos BALB/c suscetíveis (GURUNG et al., 2015b). De forma semelhante ao trabalho de Lima-Junior et al. (2013), a infecção de camundongos BALB/c com *L. major* também induz a ativação de caspase-1 e subsequente produção de IL-1 β e IL-18, no entanto, nos animais desta linhagem houve um quadro severo de edema de pata, além de alta carga parasitária. Estudos adicionais revelam o papel de IL-18 como uma “citocina patogênica”, promovendo a sobrevivência de *L. major* ao alterar o perfil de resposta das células T (GURUNG et al., 2015b).

Estes dois estudos mostram o papel destas citocinas na infecção por *Leishmania*, promovendo a multiplicação do parasito em camundongos BALB/c e inibindo sua replicação em camundongos C57BL/6 (WEI et al., 2004; BRYSON et al., 2008; VORONOV et al., 2010; KAUTZ-NEU et al., 2011). Como o receptor NLRP3 controla a produção destas citocinas, também possui a mesma função.

Pouco se sabe sobre o papel de NOD1 e NOD2 na LV humana e canina, bem como dos receptores que não formam inflamassomos. Com relação à NOD1 e NOD2, Turchetti et al. (2015) avaliaram sua expressão em macrófagos caninos infectados com *L. infantum* e observaram que a expressão constitutiva de NOD1 é baixa e de NOD2 insignificante. Apesar disso, há fortes indícios da importância dessas vias no processo inflamatório e no desenvolvimento da imunidade adaptativa (CLAY et al., 2014).

3 HIPÓTESE

A expressão dos genes TLR9, NOD1 e NOD2 influenciam no grau de sobrevivência intracelular de *Leishmania infantum*?

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

- Avaliar a relação do grau de sobrevivência intracelular de *Leishmania infantum* em macrófagos caninos e marcadores de imunidade inata.

4.2 Específicos

- Avaliar a expressão dos genes TLR9, NOD1 e NOD2 em macrófagos experimentalmente infectados por *L. infantum*;
- Verificar se existe correlação entre a expressão gênica de TLR9, NOD1 e NOD2 e a sobrevivência intracelular de *L. infantum*.

5 METODOLOGIA

5.1 Seleção dos animais e obtenção de amostras

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG, protocolo 140/2009). Todo protocolo experimental foi realizado no Laboratório de Patologia Molecular, da Escola de Veterinária/UFMG.

Para triagem de animais negativos para leishmaniose, foram selecionados 234 cães, sem padrão racial definido, de ambos os sexos e idades variando entre 1 e 8 anos, provenientes de abrigos localizados na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais.

A coleta de sangue foi feita através de venopunção cefálica, em tubos a vácuo contendo anticoagulante. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas para obtenção de soro e de papa de leucócitos.

Para avaliar a ausência de infecção por *Leishmania* spp. foi realizado o teste ELISA com antígeno recombinante rK39, como triagem. Das amostras avaliadas, 96 possuíam anticorpos anti-*Leishmania*, e foram excluídos do estudo.

As amostras negativas no ELISA foram submetidas a teste confirmatório através de PCR da papa de leucócitos, para determinar a ausência de DNA do cinetoplasto de *Leishmania*. Das 138 amostras testadas, 12 amplificaram o DNA do parasito. Portanto, dos 234 animais, 126 foram considerados negativos para a infecção.

A partir dos resultados dos dois testes, dos 126 animais clinicamente saudáveis, 43 foram selecionados para a etapa subsequente do trabalho. O critério de seleção foi o porte do animal, sendo escolhidos aqueles de maior porte, devido ao grande volume de sangue necessário para realização do cultivo celular.

5.2. Cultivo celular

A obtenção de macrófagos derivados de monócitos foi feita através de metodologia descrita por Bueno et al. (2005). Resumidamente, foram coletados 60 mL de sangue periférico dos animais selecionados, através de punção da veia jugular, em tubos contendo heparina. As amostras foram centrifugadas e, após separação do plasma, as células foram ressuspensas em

PBS, na proporção 1:1, e sobrepostas em solução de Ficoll-Paque, para separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Após separação, foi feita a lavagem do PBMC com PBS e ressuspensão em 8 mL de meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (200 mM), piruvato (10 mM), aminoácidos não essenciais (10 mM), bicarbonato de sódio (7,5% p/v), penicilina (50 UI/mL) e estreptomicina (50 µL/100 mL). A suspensão celular foi transferida para frascos de Teflon e cultivada a 37°C e 5% CO₂. Após 24 horas foi realizada a primeira troca do meio para remover as células não aderentes, com sucessivas trocas a cada três dias durante um intervalo de 10 dias.

5.3. Avaliação da viabilidade celular

Após o período de diferenciação celular, as garrafas de teflon foram colocadas no gelo por meia hora e agitadas vigorosamente para dissociação das células, conforme Bueno et al. (2005). A suspensão foi transferida para tubos Falcon, que foram centrifugados a 2000 g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi descartado e as células suspendidas em 1 mL de RPMI suplementado com SFB.

A suspensão celular foi separada em duas alíquotas: uma para avaliação da viabilidade celular e outra para extração de RNA. A alíquota para extração de RNA foi novamente centrifugada e, após descarte do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de Trizol, sendo as amostras imediatamente armazenadas em freezer - 80°C.

A avaliação da viabilidade celular foi feita através do teste de exclusão do azul de Tripán. 10 µL da suspensão celular foram adicionados a 90 µL de azul de Tripán a 0,5% e posteriormente uma gota foi colocada em câmara de Neubauer, para contagem do número de células viáveis. Após a contagem, foi feito o ajuste da concentração final de células para 8×10^4 macrófagos/mL, seguido de infecção dos macrófagos com *L. infantum*.

5.4 Infecção *in vitro* de macrófagos caninos por *L. infantum*

Para infecção dos macrófagos foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania infantum* (cepa MHOM/BR/1970/BH46), cultivadas em meio Schneider suplementado com 5% de SFB inativado, penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (50 µg/mL). Para garantir a característica de infectividade, foram utilizadas culturas de formas promastigotas com no máximo cinco passagens *in vitro*.

Os macrófagos foram infectados de acordo com a metodologia descrita por Bueno et al. (2009). Após 24 ou 72 horas de infecção foi realizada a contagem de amastigotas viáveis em câmara de Neubauer, através de coloração pelo método de Giemsa. Para tal, foi feita a contagem direta, em microscópio óptico, de 200 células escolhidas ao acaso em diferentes campos. O percentual de sobrevivência intracelular de *L. infantum* para cada animal foi determinado dividindo a média do número de amastigotas por macrófago com 72 horas de infecção pela média do número de amastigotas por macrófago com 24 horas de infecção, multiplicado por 100.

5.5 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol, de acordo com o protocolo do fabricante. A solução de células em Trizol foi retirada do freezer -80°C e incubada em temperatura ambiente por cinco minutos, para completar a dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguido de agitação vigorosa por 15 segundos. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por dois minutos antes de serem centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Aproximadamente 550 µL da fase superior aquosa foram transferidos para outro tubo eppendorf de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol para precipitar o RNA. Os tubos foram invertidos vagarosamente e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos até nova centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1 mL de etanol 75%, seguido de homogeneização e centrifugação a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em aproximadamente 40 µL de água DEPC e incubado por 10 minutos a 55°C. Aliquotas para dosagem de RNA em espectrofotômetro foram feitas e o RNA congelado a -80°C até confecção de cDNA.

5.6 Confecção de cDNA

Para confecção do cDNA foi utilizado o kit TaqMan Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Para um volume final de 20 µL de cDNA, foram utilizados no preparo do mix 4,7 µL de água DEPC, 4,4 µL de MgCl₂, 4 µL de dNTPs, 1 µL de hexâmeros, 0,4 µL de inibidor de RNases, 2 µL de tampão, 0,5 µL de transcriptase reversa e 3 µL de RNA das amostras, em uma concentração de 500 ng/µL. As amostras foram levadas para o termociclador, nos seguintes ciclos: 25°C por 10 minutos, 48°C por 30 minutos e 95°C por 5 minutos.

5.7 Quantificação de mRNA de genes de imunidade inata através de qPCR

A expressão de mRNA dos genes da imunidade inata TLR9, NOD1 e 2, além da β -actina, foi mensurada por PCR em tempo real. Para cada reação foi utilizado 2,5 μ L de cDNA, 1 μ L de cada primer a 10 μ M (Tabela 2), 12,5 μ L de SYBR Green PCR Master Mix e 8 μ L de água DEPC, com os seguintes parâmetros de ciclagem: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os dados foram analisados pelo método CT comparativo, e os valores de CT normalizados com base na expressão de β -actina.

Tabela 2 - Lista de genes e primers utilizados na qPCR

Sequência alvo	Primers
TLR9	5'-CGCAGACTCAACCTGTCCTT-3' 5'-GCCATGTATGTCCAGCTCCT-3'
NOD1	5'-AGAGCAAGGGTGAAGAAGCA-3' 5'-GAGAAGCCAATCTCCGACAG-3'
NOD2	5'-ACTGCTGTTGGCCTGACTTT-3' 5'-TGAACATCAAAAGCCATCG-3'
β -actina	5'-GGCATCCTGACCCTGAAGTA-3' 5'-CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT-3'

Referência dos genes utilizados: Turchetti et al. (2015).

5.8 Análise estatística

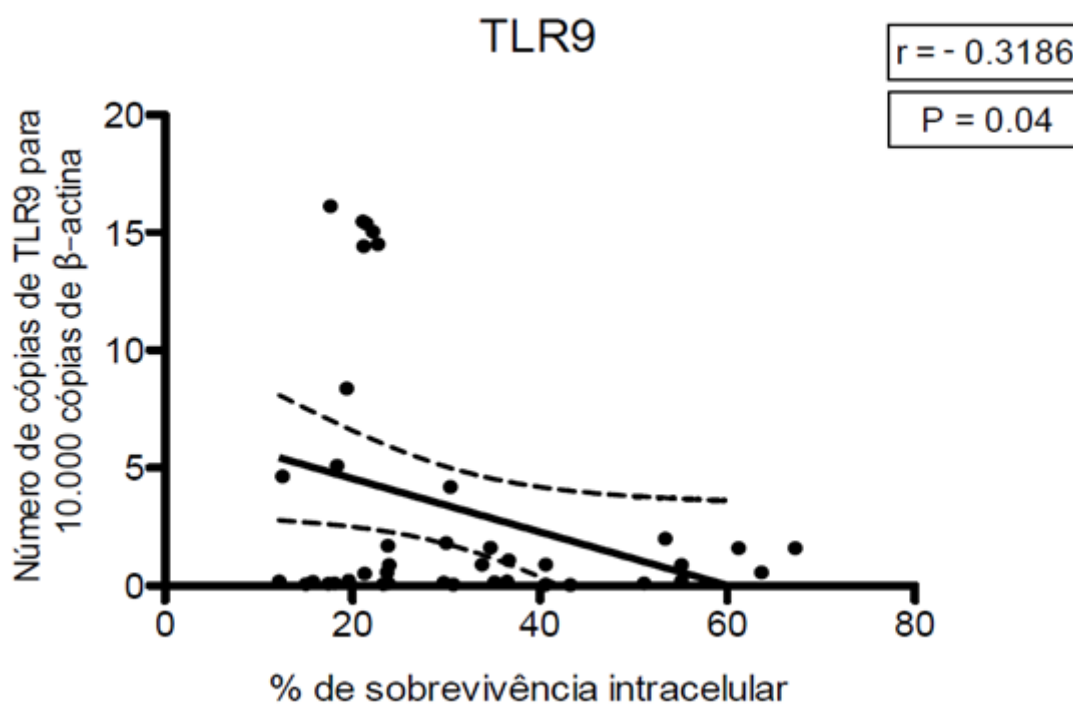
Os dados de expressão gênica foram normalizados com base na expressão de β -actina. Para avaliar a existência de correlação entre sobrevivência intracelular de *L. infantum* e expressão dos genes, a correlação de Pearson foi utilizada, através do programa GraphPad Prism 5. Foram considerados valores significativos quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Os resultados mostram que a expressão constitutiva de TLR9 e NOD2 é extremamente reduzida e a de NOD1 é baixa, quando comparados ao gene de referência, β -actina.

O gráfico 1 mostra a expressão de TLR9, em uma proporção de aproximadamente 5 cópias do gene para 10.000 cópias de β -actina. É possível observar também que, à medida que houve o aumento da taxa de sobrevivência intracelular de *L. infantum*, houve diminuição da expressão gênica, indicando uma correlação negativa entre as duas variáveis ($r = -0,3186$) que, embora fraca, é estatisticamente significativa ($p = 0,04$).

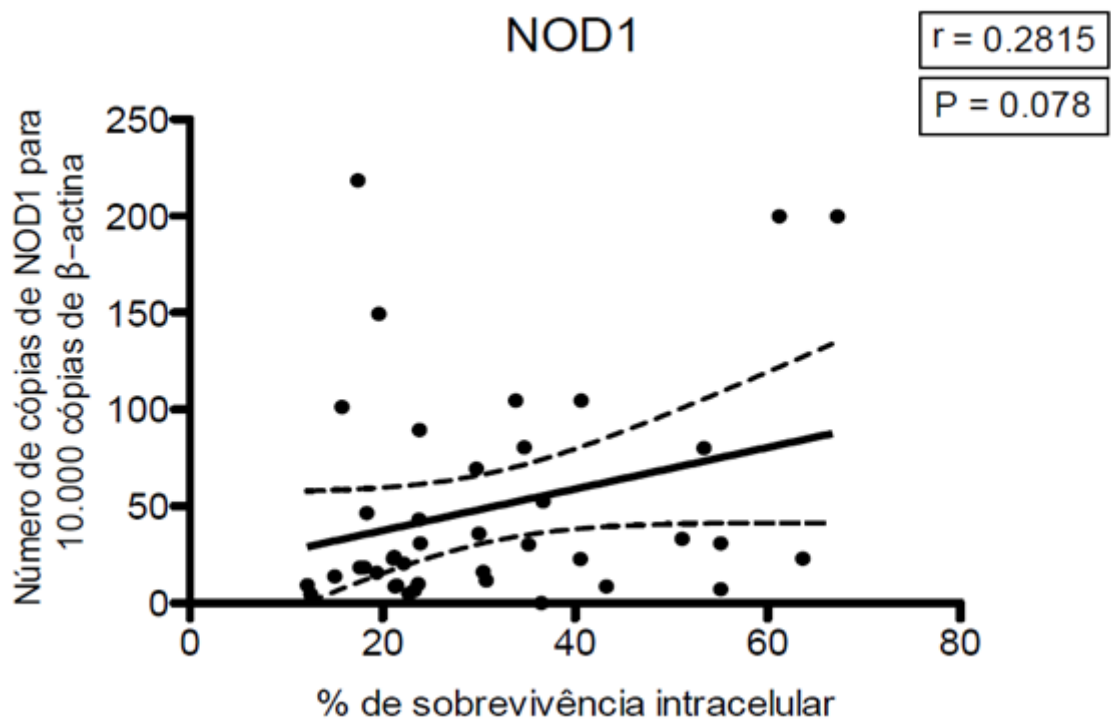
Gráfico 1 - Estudo de correlação de Pearson entre a expressão gênica de TLR9 e sobrevivência intracelular de *Leishmania infantum* em macrófagos caninos.



r: coeficiente de correlação; p: nível de significância (<0,05).

No gráfico 2 é possível observar a baixa expressão do receptor NOD1 e, embora sua transcrição seja maior à proporção que o percentual de sobrevivência de *L. infantum* aumenta, não há correlação positiva estatisticamente significativa entre as variáveis.

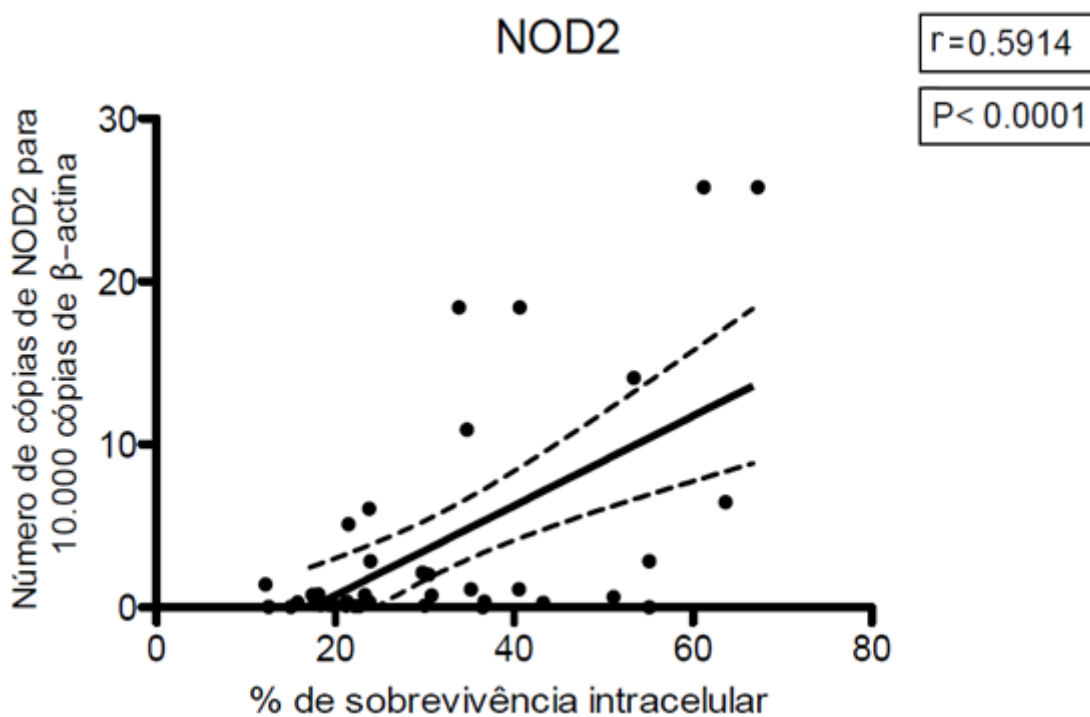
Gráfico 2 - Estudo de correlação de Pearson entre a expressão gênica de NOD1 e sobrevivência intracelular de *Leishmania infantum* em macrófagos caninos.



r - coeficiente de correlação; p - nível de significância (<0,05).

No gráfico 3, observa-se que, apesar de haver uma baixa expressão constitutiva de NOD2 nos macrófagos, existe uma interessante correlação positiva entre a quantidade de transcritos de NOD2 pré-infecção ($r = 0,5914$) com a sobrevivência intracelular de *L. infantum*.

Gráfico 3 - Estudo de correlação de Pearson entre a expressão gênica de NOD2 e sobrevivência intracelular de *Leishmania infantum* em macrófagos caninos.



r - coeficiente de correlação; p - nível de significância ($<0,05$).

7 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que, na infecção experimental de macrófagos caninos, a baixa expressão dos genes TLR9, NOD1 e NOD2 interfere na sobrevivência de amastigotas de *L. infantum*. Nos gráficos observa-se que a maior parte das amostras apresentou um padrão de expressão gênica semelhante, dentro de um intervalo de confiança delimitado entre a reta e as linhas tracejadas. Os pontos de dispersão presentes nas três análises correspondem às amostras que obtiveram maior expressão constitutiva dos genes estudados. Provavelmente essa dispersão está relacionada com a variação individual em decorrência da idade, assim as amostras que tiveram maior expressão dos receptores podem ser provenientes de animais mais jovens.

A imunidade inata, em particular certas respostas mediadas por TLRs, muda drasticamente ao longo da vida (PANDA et al., 2009). Há relatos de que as células dendríticas diminuem a capacidade de apresentação de antígenos, com consequente falha na ativação das células da reposta adaptativa. Essa alteração na resposta imunológica começa a ser detectada a partir da involução do timo, quando há uma diminuição significativa da população de células T *naïves*. Assim, cada vez que essas células são expostas aos antígenos há uma consequente diminuição da sua população. Sabe-se que as células T efectoras produzem maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias que, associadas às células da imunidade inata ativadas, contribuem para o desenvolvimento de uma resposta pró-inflamatória sistêmica em indivíduos mais velhos (GIEFING-KRÖLL et al., 2015).

A senescência do sistema imunológico também está associada à ineficiência dos mecanismos de sinalização dos PRRs, que pode ser explicada em parte por alterações na expressão de proteínas dos receptores nas células de indivíduos mais velhos. Já os efeitos do envelhecimento sobre os PRRs citoplasmáticos, como os NLRs, continuam a ser investigados (SHAW et al., 2013).

Em um estudo sobre a influência do envelhecimento na expressão de TLRs, foi observado que em macrófagos esplênicos e peritoneais de camundongos velhos há expressão reduzida de TLR 1 a 9, com maior declínio na expressão de TLR9 (RENSHAW et al., 2002). Além disso, algumas vias de sinalização celular envolvidas na indução de respostas imunológicas apresentaram eficiência diminuída com o avanço da idade, como por exemplo,

o aumento da fosforilação do inibidor de κB (I κ B), levando à translocação elevada de NF κ B para o núcleo em macrófagos peritoneais de camundongos velhos (WU et al., 2003).

Diante da constatação de que, desde os primórdios da humanidade, a expectativa de vida da mulher sempre foi mais elevada que a do homem, especula-se que os hormônios sexuais também possam induzir alterações no sistema imunológico. Em cães da raça Labrador Retriever foi observado que as fêmeas apresentavam aumento significativo de linfócitos T ao longo da vida e que nos machos, as células NK eram mais ativas (GREELEY et al., 2001).

Apesar de estudos mostrarem que há relação entre idade e expressão de TLRs e NLRs no modelo murino e em seres humanos, em cães não há relatos de que esses receptores tenham sua expressão alterada ao longo da vida. Provavelmente os mesmos mecanismos observados no camundongo e no homem ocorram no cão, ou seja, os animais mais jovens apresentam alta expressão destes receptores, a qual diminui com a idade.

Dentre os receptores estudados, TLR9 foi o que apresentou menor expressão nos macrófagos caninos. Isto significa que esse receptor exerce um papel fundamental no controle da infecção por *Leishmania*, pois mesmo sendo pouco expresso evidenciou-se que à medida que diminuiu o número de transcritos houve aumento da sobrevivência do parasito.

TLR9 auxilia na imunidade protetora contra a infecção por *Leishmania*, especialmente no modelo murino e no homem. De modo geral, sua expressão está relacionada ao controle da carga parasitária no hospedeiro e na indução da produção de IL-12 (LIESE et al., 2007). O receptor TLR2 pode limitar a resposta imunológica de TLR9 do hospedeiro, conforme descrevem Srivastava et al. (2013) que, ao bloquearem os receptores de TLR2 de camundongos suscetíveis a infecção por *Leishmania*, observaram aumento na expressão do TLR9 e, conseqüentemente diminuição da carga parasitária no linfonodo drenante, além do aumento da produção de IFN γ . Além disso, Sacramento et al. (2015) sugerem que TLR9 também contribui para o recrutamento dos neutrófilos, que pode estar associado a ativação de células dendríticas.

O aumento da expressão deste receptor na infecção por *L. major* favorece o desenvolvimento da resposta imune Th1 e a resolução das lesões cutâneas em camundongos C57BL/6 (ABOU FAKHER et al., 2009). Por outro lado, a baixa expressão de TLR9 reduz a hiperceluridade nos linfonodos, tornando mais difícil conter a infecção, uma vez que o controle do parasito está relacionado a uma forte resposta de células T e a hipertrofia dos

linfonodos é um evento que favorece o desenvolvimento de uma resposta efetiva destas células (CARVALHO et al., 2012).

A expressão de TLR9 também é importante no controle da infecção e na redução da carga parasitária de camundongo infectados por *L. braziliensis* (WEINKOPFF et al., 2013). Camundongos C57BL/6 *knockout* para o gene TLR9 são mais susceptíveis à infecção por *L. infantum* e apresentam carga parasitária maior no baço e no fígado (SACRAMENTO et al., 2015).

Há poucos trabalhos na literatura sobre o papel que este receptor desempenha na infecção canina (FIGUEIREDO et al., 2013; MELO et al., 2014; HOSEIN et al., 2015; TURCHETTI et al., 2015). Foi observado o aumento da expressão de TLR9 associado a menor carga parasitária no jejuno de cães infectados com *L. infantum* (FIGUEIREDO et al., 2013) e elevada expressão de TLR9 no plexo coróide do cérebro de animais naturalmente infectados com *L. infantum* (MELO et al., 2014). À semelhança dos nossos resultados, Turchetti et al. (2015) também observaram níveis mínimos de transcritos de TLR9 em macrófagos infectados.

No nosso trabalho, os baixos níveis de expressão de TLR9 e o aumento da sobrevivência intracelular de *L. infantum* podem ser sugestivos de um mecanismo de evasão do parasito, de modo a facilitar o desenvolvimento da doença, ao reduzir ou limitar a transcrição deste receptor que, em outras circunstâncias, exibe um papel protetor.

Normalmente os sistemas de reconhecimento citoplasmáticos são eficientes na identificação de patógenos intracelular e, conseqüentemente estimulam a resposta imunológica, o que não foi observado na infecção por *Leishmania*. Ao contrário, NOD1 e NOD2 tiveram níveis de expressão basal bem baixos, especialmente NOD2. Além disso, NOD2 ainda apresentou correlação positiva com as taxas de sobrevivência de amastigotas de *L. infantum*, demonstrando que, mesmo pouco expresso, favorece o crescimento do parasito e o estabelecimento da infecção. Partindo desse pressuposto, pode-se especular que esses receptores não estão envolvidos diretamente no reconhecimento de *L. infantum* ou então são poucos expressos nos macrófagos caninos. Por isso são necessários mais experimentos para compreender os mecanismos destes receptores na imunopatologia da LVC.

Os TLRs e NLRs podem agir de forma sinérgica, complementar ou compensatória, com o objetivo de aumentar a sensibilidade para detectar e eliminar de forma mais eficiente

micro-organismos patogênicos (OVIEDO-BOYSO et al., 2014). Em cultura de células monocíticas humanas, observou-se produção acentuada de IL-8 decorrente do sinergismo entre NOD1 e 2 e TLR2, 4 e 9 (UEHARA et al., 2005). Já o estímulo simultâneo de células dendríticas com ligantes de NOD1 e 2, combinados com agonistas de TLR4, 7 ou 8, resultou em produção aumentada de IL-1 β e IL-23 (SCHWARZ et al., 2013). Ferwerda et al. (2005) demonstraram que tanto TLR2 e NOD2 reconhecem *Mycobacterium tuberculosis* e que existe uma ação sinérgica entre os dois receptores para expressão de citocinas. Isto demonstra a existência de uma ação cooperativa entre TLRs e NLRs, relevante em um contexto em que favorece o reconhecimento de patógenos por receptores extra e intracitoplasmáticos.

NOD1 e NOD2 são codificados pelos genes *card4* e *card15*, respectivamente, e reconhecem frações de peptidoglicanos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (INOHARA et al., 2002). Entretanto, há um número crescente de relatos que indicam que eles também podem ser importantes em infecções causadas por agentes patogênicos não-bacterianos. Neste contexto, é importante determinar se estes são receptores genuínos para estes patógenos ou se participam de vias de sinalização desencadeadas por outras moléculas da imunidade inata (MOREIRA E ZAMBONI, 2012).

Estudos realizados com outros protozoários intracelulares, como *Plasmodium berghei* ANKA e *Trypanosoma cruzi*, indicaram que NOD2 não foi necessário para a proteção do hospedeiro contra estes parasitas (FINNEY et al., 2009; SILVA et al., 2010). Em contraste, NOD1 foi associado à resistência do hospedeiro contra a infecção por *T. cruzi* *in vivo* (SILVA et al., 2010), no entanto, ele sozinho pode direcionar para uma resposta do perfil Th2 (KAWAI E AKIRA, 2009).

A função de NOD1 e NOD2 na LVC ainda não é bem conhecida, havendo apenas um relato de Turchetti et al. (2015), que evidenciaram baixos níveis de transcrição de ambos os receptores, além de correlação negativa entre expressão gênica de NOD2 e sobrevivência intracelular. Embora nosso experimento tenha sido realizado nas mesmas condições experimentais ao dos autores supracitados, alguns resultados são divergentes.

A LVC, além do caráter endêmico no Brasil, tem apresentado formas clínicas cada vez mais severas, além disso, os estudos dos mecanismos imunológicos são muito controversos. Por isso, o estudo dos receptores do tipo NOD na doença canina pode abrir novas perspectivas no controle e tratamento da doença, pois conhecer a função desses e de outros receptores poderão elucidar a patogênese tanto da infecção experimental quanto da infecção natural.

8 CONCLUSÕES

- Os receptores TLR9, NOD2 e NOD2 influenciam na sobrevivência intracelular de *L. infantum*;
- A correlação positiva de NOD2 e a sobrevivência intracelular de *L. infantum* pode ser indicativa de sinergismo com outros receptores expressos em macrófagos caninos, que orquestram a resposta protetora.

REFERÊNCIAS

- ABOU FAKHER, F.H.; RACHINEL, N.; KLIMCZAK, M.; LOUIS, J.; DOYEN, N. TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. **Journal of Immunology**, v. 182, p. 1386-1396, 2009.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783-801, 2006.
- ALVAR, J. VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in Parasitology**, v. 64, p. 1-109, 2007.
- BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G.; BASTOS, F.I.; XIMENES, R.A.; BARATA, R.B.; RODRIGUES, L.C. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet**, v. 377, p. 1877-1889, 2011.
- BARTON, G.M.; KAGAN, J.C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. **Nature Reviews. Immunology**, v. 9, p. 535-542, 2009.
- BARTON, G.M.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor signaling pathways. **Science**, v. 300, p. 1524-1525, 2003.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.
- BECKER, I.; SALAIZA, N.; AGUIRRE, M.; DELGADO, J.; CARRILLO-CARRASCO, N.; KOBEH, L.G. et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 130, p. 65-74, 2003.
- BERESFORD, G.W.; BOSS, J.M. CIITA coordinates multiple histone acetylation modifications at the HLA-DRA promoter. **Nature Immunology**, v. 2, p. 652-657, 2001.
- BLASIUS, A.L.; BEUTLER, B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**, v. 32, 305-315, 2010.
- BOTOS, I.; SEGAL, D.M.; DAVIES, D.R. The structural biology of Toll-like receptors. **Structure**, v. 19, p. 447-459, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8ed. revisada. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 444p.

BRYSON, K.J.; WEI, X.Q.; ALEXANDER, J. Interleukin-18 enhances a Th2 biased response and susceptibility to *Leishmania mexicana* in BALB/c mice. **Microbes and infection/Institut Pasteur**, v. 10, p. 834-839, 2008.

BUENO, R.; MELLO, M.N.; MENEZES, C.A.S.; DUTRA, W.O.; SANTOS, R.L. Phenotypic, functional, and quantitative characterization of canine peripheral blood monocyte-derived macrophages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 521-524, 2005.

BUENO, R.; CARVALHO NETA, A.V.; XAVIER, M.N.; OLIVEIRA, R.G.; DINIZ, S.A.; MELO, M.N. et al. cDNA sequencing and expression of Nramp1 (Slc11a1) in dogs phenotypically resistant or susceptible to visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, p. 332-339, 2009.

CARVALHO, L.P.; PETRITUS, P.M.; TROCHTENBERG, A.L.; ZAPH, C.; HILL, D.A.; ARTIS, D. et al. Lymph node hypertrophy following *Leishmania major* infection is dependent upon TLR9. **Journal of Immunology**, v. 188, p. 1394-1401, 2012.

CELHAR, T.; MAGALHAES, R.; FAIRHURST, A.M. TLR7 and TLR9 in SLE: When sensing self goes wrong. **Immunologic Research**, v. 53, p. 58-77, 2012.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CLAY, G.M.; SUTTERWALA, F.S.; WILSON, M.E. NLR proteins and parasitic disease. **Immunologic Research**, v. 59, p. 142-152, 2014.

DA SILVA, A.V.M.; DE SOUZA CÂNDIDO, C.D.; PITA-PEREIRA, D.; BRAZIL, R.P.; CARREIRA, J.C.A. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v. 20, p. 92-94, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 151-156, 2006.

DE SOUZA, A.I.; BARROS, E.M.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I.M.; MARIN, G.R.; NUNES, V.L. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 41-45, 2005.

DE VEER, M.J.; CURTIS, J.M.; BALDWIN, T.M.; DIDONATO, J.A.; SEXTON, A.; MCCONVILLE, M.J. et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and toll-like receptor 2 signaling. **European Journal of Immunology**, v. 33, p. 2822-2831, 2003.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.

ERMOLAEVA, M.A.; MICHALLET, M.C.; PAPADOPOULOU, N.; UTERMÖHLEN, O.; KRANIDIOTI, K.; KOLLIAS, G. et al. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor

1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. **Nature Immunology**, v. 9, p. 1037-1046, 2008.

FARIA, M.S.; REIS, F.C.G.; LIMA, A.P.C.A. Toll-like receptors in *Leishmania* infections: guardians or promoters? **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012. doi:10.1155/2012/930257.

FERWERDA, G.; GIRARDIN, S.E.; KULLBERG, B.; LE BOURHIS, L.; DE JONG, D.J.; LANGENBERG, D.M.L. et al. NOD2 and Toll-Like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathogens**, v. 1, 2005. doi:10.1371/journal.ppat.0010034.

FIGUEIREDO, M.M.; AMORIM, I.F.; PINTO, A.J.; BARBOSA, V.S.; DE JESUS PINHEIRO, L.; DEOTI, B. et al. Expression of Toll-like Receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. **BMC Immunology**, v. 14, 2013. doi:10.1186/1471-2172-14-22.

FINNEY, C.A.; LU, Z.; LEBOURHIS, L.; PHILPOTT, D.J.; KAIN, K.C. Disruption of Nod-like receptors alters inflammatory response to infection but does not confer protection in experimental cerebral malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 718-722, 2009.

FITZGERALD, K.A.; MCWHIRTER, S.M.; FAIA, K.L.; ROWE, D.C.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D.T. et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. **Nature Immunology**, v. 4, p. 491-496, 2003.

FLANDIN, J.F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 36, p. 411-420, 2006.

FRANCHI, L.; WARNER, N.; VIANI, K.; NUÑEZ, G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunological Reviews**, v. 227, p. 106-128, 2009.

GIEFING-KRÖLL, C.; BERGER, P.; LEPPERDINGER, G.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. **Aging cell**, v. 14, p. 309-321, 2015.

GREELEY, E.H.; BALLAM, J.M.; HARRISON, J.M.; KEALY, R.D.; LAWLER, D.F.; SEGRE, M. The influence of age and gender on the immune system: a longitudinal study in Labrador Retriever dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, p. 57-71, 2001.

GUPTA, G., OGHUMU, S.; SATOSKAR, A.R. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 82, p. 155-184, 2013.

GURUNG, P.; LUKENS, J.R.; KANNEGANTI, T.D. Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, p. 193-201, 2015a.

GURUNG, P.; KARKI, R.; VOGEL, P.; WATANABE, M.; BIX, M.; LAMKANFI, M. et al. An NLRP3 inflammasome triggered Th2-biased adaptive immune response promotes Leishmaniasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, p. 1329-1338, 2015b.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 403-409, 2011.

HASEGAWA, M.; YANG, K.; HASHIMOTO, M.; PARK, J.H.; KIM, Y.G.; FUJIMOTO, Y. et al. Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 29054-29063, 2006.

HIBINO, T.; LOZA-COLL, M.; MESSIER, C.; MAJESKE, A.J.; COHEN, A.H.; TERWILLIGER, D.P. et al. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. **Developmental Biology**, v. 300, p. 349-365, 2006.

HOLZMULLER, P.; CAVALEYRA, M.; MOREAUX, J.; KOVACIC, R.; VINCENTEAU, P.; PAPIEROK, G. et al. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, p. 247-257, 2005.

HOSEIN, S.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; BLAKE, D.P.; ALLENSPACH, K.; ALBEROLA, J.; SOLANO-GALLEGO, L. Transcription of toll-like receptors 2, 3, 4 and 9, foxp3 and th17 cytokines in a susceptible experimental model of canine *Leishmania infantum* infection. **PLoS One**, v. 10, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0140325.

INOHARA, N.; NUÑEZ, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 371-382, 2003.

INOHARA, N.; OGURA, Y.; NUNEZ, G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 76-80, 2002.

JANSSENS, S.; R. BEYAERT. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 637-646, 2003.

JONES, J.D.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006.

KANNEGANTI, T.; LAMKANFI, M.; NÚÑEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. **Immunity**, v. 27, p. 549-559, 2007.

KARMAKAR, S.; BHAUMIK, S.K.; PAUL, J.; DE, T. TLR4 and NKT cell synergy in immunotherapy against visceral Leishmaniasis. **PLOS Pathogens**, v. 8, 2012. doi: 10.1371/journal.ppat.1002646.

KAUTZ-NEU, K.; KOSTKA, S.L.; DINGES, S.; IWAKURA, Y., UDEY, M.C.; VON STEBUT, E. IL-1 signalling is dispensable for protective immunity in *Leishmania*-resistant mice. **Experimental Dermatology**, v. 20, p. 76-78, 2011.

KAVOOSI, G., ARDESTANI, S.K.; KARIMINIA, A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). **Parasitology**, v. 136, p. 1193-1199, 2009.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v. 21, p. 317-337, 2009.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, p. 373-384, 2010.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, p. 637-650, 2011.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Human Vaccines**, v. 7, p. 1204-1214, 2011.

KHEIRANDISH, F.; SHARAFI, A.C.; KAZEMI, B.; BANDEHPOUR, M.; TARAHI, M.J.; KHAMESIPOUR, A. First molecular identification of *Leishmania* species in a new endemic area of cutaneous leishmaniasis in Lorestan, Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, p. 713-717, 2013.

KOBAYASHI, K.S.; CHAMAILLARD, M.; OGURA, Y.; HENEGARIU, O.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. **Science**, v. 307, p. 731-734, 2005.

KROPF, P.; FREUDENBERG, M.A.; MODOLELL, M.; PRICE, H.P.; HERATH, S.; ANTONIAZI, S. et al. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 1920-1928, 2004a.

KROPF, P.; FREUDENBERG, N.; KALIS, C.; MODOLELL, M.; HERATH, S.; GALANOS, C. et al. Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCR mice with *Leishmania major* reveals a role for toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, p. 48-57, 2004b.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V.M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, p. 1013-1022, 2014.

LECINE, P.; ESMIOL, S.; METAIS, J.Y.; NICOLETTI, C.; NOURRY, C.; McDONALD, C. et al. The NOD2-RICK complex signals from the plasma membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 15197-15207, 2007.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, p. 973-983, 1996.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 3424-3434, 2007.

LIMA-JUNIOR, D.S.; COSTA, D.L.; CARREGARO, V.; CUNHA, L.D.; SILVA, A.L.; MINEO, T.W. et al. Inflammasome derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**, v. 19, p. 909-915, 2013.

LIU, D.; RHEBERGEN, A.M.; EISENBARTH, S.C. Licensing adaptive immunity by NOD-like receptors. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013. doi:10.3389/fimmu.2013.00486.

MAIA-ELKHOURY, A.N.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; SENA, J.M.; LUNA, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 2941-2947, 2008.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL- β . **Molecular Cell**, v. 10, p. 417-426, 2002.

MASTERNAK, K.; MUHLETHALER-MOTTET, A.; VILLARD, J.; ZUFFEREY, M.; STEIMLE, V.; REITH, W. CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. **Genes & Development**, v. 14, p. 1156-1166, 2000.

MEDZHITOV, R.; PRESTONHURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, p. 394-397, 1997.

MELO, G.D.; SILVA, J.E.; GRANO, F.G.; HOMEM, C.G.; MACHADO, G.F. Compartmentalized gene expression of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in the brain and peripheral lymphoid organs during canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 36, p. 726-731, 2014.

MONTEIRO, M.E.Z.; BARUQUE, M.; NEVES, M.F. Leishmaniose Visceral em cães: Relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, p. 1-5, 2009.

MOREIRA, L.O.; ZAMBONI, D.S. NOD signaling in infection and inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012. doi: 10.3389/fimmu.2012.00328.

MOTTA, V.; SOARES, F.; SUN, T.; PHILPOTT, D.J. Nod-like receptors: versatile cytosolic sentinels. **Physiological Reviews**, v. 95, p. 149-178, 2015.

ODA, K.; KITANO, H. A comprehensive map of the Toll-like receptor signaling network. **Molecular Systems Biology**, v. 2, 2006. doi:10.1038/msb4100057.

OLIVEIRA, F.S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M.Q.; BRAZIL, R.P.; PACHECO, R.S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 219-227, 2005.

OLIVEIRA, F.S.; VALETE-ROSALINO, C.M.; PACHECO, S.J.B.; CARVALHO COSTA, F.A.; SCHUBACH, A.O.; PACHECO, R.S. American tegumentary leishmaniasis caused by

Leishmania (Viannia) braziliensis: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. **Parasites and Vectors**, v. 6, 2013. doi:10.1186/1756-3305-6-189.

O'NEILL, L.A.; BOWIE, A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 353-364, 2007.

OVIEDO-BOYSO, J.; BRAVO-PATÍÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M. Collaborative action of Toll-like and Nod-like receptors as modulators of the inflammatory response to pathogenic bacteria. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014. doi: dx.doi.org/10.1155/2014/432785.

PANDA, A.; ARJONA, A.; SAPEY, E.; BAI, F.; FIKRIG, E.; MONTGOMERY, R.R et al. Human innate immunosenescence: Causes and consequences for immunity in old age. **Trends of Immunology**, v. 30, p. 325-333, 2009.

PANDEY, S.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Microbial sensing by Toll-Like receptors and intracellular nucleic acid sensors. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, 2014. doi: 10.1101/cshperspect.a016246.

PAUL, J.; KARMAKAR, S.; DE, T. TLR-mediated distinct IFN-gamma/IL-10 pattern induces protective immunity against murine visceral Leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 42, p. 2087-2099, 2012.

PENAFORTE, K.M.; BELO, V.S.; TEIXEIRA-NETO, R.G.; RIBEIRO, R.A.; DE OLIVEIRA, R.B.; SCHETTINI, D.A. *Leishmania* infection in a population of dogs: an epidemiological investigation relating to visceral leishmaniasis control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p.592-596, 2013.

PHILPOTT, D.J.; SORBARA, M.T.; ROBERTSON, S.J.; CROITORU, K.; GIRARDIN, S.E. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 9-23, 2014.

RAMAN, V.S.; BHATIA, A.; PICONE, A.; WHITTLE, J.; BAILOR, H.R.; O'DONNELL, J. et al. Applying TLR synergy in immunotherapy: implications in cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 185, p. 1701-1710, 2010.

RENSHAW, M.; ROCKWELL, J.; ENGLEMAN, C.; GEWIRTZ, A.; KATZ, J.; SAMBHARA, S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 4697-4701, 2002.

SACRAMENTO, L.; TREVELIN, S.C.; NASCIMENTO, M.S.; LIMA-JUNIOR, D.S.; COSTA, D.L.; ALMEIDA, R.P. et al. Toll-like receptor 9 signaling in dendritic cells regulates neutrophil recruitment to inflammatory foci following *Leishmania infantum* infection. **Infection and Immunity**, v. 83, p. 4604-4616, 2015.

SAFAIYAN, S.; BOLHASSANI, A.; NYLEN, S.; AKUFFO, H.; RAFATI, S. Contribution of human neutrophils in the development of protective immune response during *in vitro* *Leishmania major* infection. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 609-620, 2011.

SCHALLIG, H.D.; DA SILVA, E.S.; VAN DER MEIDE, W.F.; SCHOONE, G.J.; GONTIJO, C.M. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, p. 387-393, 2007.

SCHAMBER-REIS, B.L.; PETRITUS, P.M.; CAETANO, B.C.; MARTINEZ, E.R.; OKUDA, K.; GOLENBOCK, D. et al. UNC93B1 and nucleic acid-sensing toll-like receptors mediate host resistance to infection with *Leishmania major*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 7127-7136, 2013.

SCHLEICHER, U.; LIESE, J.; KNIPPERTZ, I.; KURZMANN, C.; HESSE, A.; HEIT, A. et al. NK cell activation in visceral Leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 893-906, 2007.

SCHWARZ, H.; POSSELT, G.; WURM, P.; ULBING, M.; DUSCHL, A.; HOREJS-HOECK, J. TLR8 and NOD signaling synergistically induce the production of IL-1 β and IL-23 in monocyte-derived DCs and enhance the expression of the feedback inhibitor SOCS2. **Immunobiology**, v. 218, p. 533-542, 2013.

SHAW, A.C.; GOLDSTEIN, D.R.; MONTGOMERY, R.R. Age-dependent dysregulation of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 875-887, 2013.

SILVA, E.S.; PIRMEZ, C.; GONTIJO, C.M.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **The Veterinary Record**, v. 147, p. 421-422, 2000.

SILVA, G.K.; GUTIERREZ, F.R.; GUEDES, P.M.; HORTA, C.V.; CUNHA, L.D.; MINEO, T.W. et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 1148-1152, 2010.

SINAN. Ministério da Saúde. 2013. **Leishmaniose Visceral a partir de 2007**. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>. Acesso em 20/01/2016.

SINGH, R.K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, N. Toll-like receptor signaling: A perspective to develop vaccine against leishmaniasis. **Microbiological Research**, v. 167, 445-451, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1-18, 2009.

SRIVASTAV, S.; KAR, S.; CHANDE, A.G.; MUKHOPADHYAYA, R.; DAS, P.K. *Leishmania donovani* exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response. **Journal of Immunology**, v. 189, p. 924-934, 2012.

SRIVASTAVA, S.; PANDEY, S.P.; JHA, M.K.; CHANDEL, H.S.; SAHA, B. *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9

expression and reduce anti-leishmanial responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 172, p. 403-409, 2013.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 951-958, 2002.

SURESH, R.; MOSSER, D.M. Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. **Advances in Physiology Education**, v. 37, p. 284-291, 2013.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, p. 1-14, 2005.

TANG, D.; KANG, R.; COYNE, C.B.; ZEH, H.J.; LOTZE, M.T. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. **Immunological Reviews**, v. 249, p. 158-175, 2012.

TENÓRIO, M.S.; OLIVEIRA E SOUSA, L.; PAIXÃO, M.S.; ALVES, M.F.; PAULAN, S.C.; LIMA, F.L. et al. Visceral leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, p. 608-616, 2011.

TING, J.P.; LOVERING, R.C.; ALNEMRI, E.S.; BERTIN, J.; BOSS, J.M.; DAVIS, B.K. et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. **Immunity**, v. 28, p. 285-287, 2008.

TUON, F.F.; AMATO, V.S.; BACHA, H.A.; ALMUSAWI, T.; DUARTE, M.I.; AMATO NETO, V. Toll-Like Receptors and Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 866-872, 2008.

TURCHETTI, A.P.; DA COSTA, L.F.; ROMÃO, E DE L.; FUJIWARA, R.T.; DA PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, p. 67-76, 2015.

UEHARA, A.; YANG, S.; FUJIMOTO, Y.; FUKASE, K.; KUSUMOTO, S.; SHIBATA, K. et al. Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 53-61, 2005.

VORONOV, E.; DOTAN, S.; GAYVORONSKY, L.; WHITE, R.M.; COHEN, I.; KRELIN, Y. et al. IL-1-induced inflammation promotes development of Leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. **International Immunology**, v. 22, p. 245-257, 2010.

WEI, X.Q.; NIEBALA, W.; XU, D.; LUO, Z.X.; POLLOCK, K.G.; BREWER, J.M. Host genetic background determines whether IL-18 deficiency results in increased susceptibility or resistance to murine *Leishmania major* infection. **Immunology Letters**, v. 94, p. 35-37, 2004.

WEINKOPFF, T.; MARIOTTO, A.; SIMON, G.; HAUYON-LA TORRE, Y.; AUDERSET, F.; SCHUSTER, S. et al. Role of toll-like receptor 9 signaling in experimental *Leishmania braziliensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 1575-1584, 2013.

WERNECK, G.L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 851-855, 2014.

WHO. World Health Organization, 2015. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em 07/11/15.

WU, D.; MARKO, M.; CLAYCOMBE, K.; PAULSON, K.E.; MEYDANI, S.N. Ceramide-induced and age-associated increase in macrophage COX-2 expression is mediated through up-regulation of NF-kappa B activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 10983-10992, 2003.

ZHONG, Y.; KINIO, A.; Saleh, M. Functions of NOD-like receptors in human diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013. doi: 10.3389/fimmu.2013.00333.