

# **A IMPORTÂNCIA DOS MODELOS MURINOS NA CARACTERIZAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS ÀS LEISHMANIOSES: UMA REVISÃO**

## **THE IMPORTANCE MURINE MODELS IN CHARACTERIZATION OF THE IMMUNE RESPONSE AGAINST LEISHMANIASIS: A REVIEW**

### **Caio Cotta Natale**

Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Bioquímica e Imunologia,  
Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia.  
Os autores contribuíram igualmente na  
composição do artigo.

**E-mail:** caio.natale@gmail.com

### **Paula Melo Seixas**

Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Bioquímica e Imunologia,  
Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia.  
Os autores contribuíram igualmente na  
composição do artigo.

### **Daniel Manzoni de Almeida**

Docente Faculdades Metropolitanas Unidas  
(FMU), Grupo de Estudos e Pesquisa em  
Ensino de Biologia (GEPEB), Faculdade de  
Educação, Universidade de São Paulo, Sócio  
Fundador e Professor da Conecta Ciência.

## **Resumo**

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania sp.* O grande número dos estudos na construção do conhecimento sobre as formas clínicas das leishmanioses, principalmente na área da Imunologia, contribui para a compreensão dos processos imunológicos envolvidos na resposta às infecções por *Leishmania*. Propostas de vacinas e tratamentos farmacológicos para essas doenças são, também, realizados em modelos de camundongos (murinos). Aqui, nosso objetivo foi realizar uma revisão ampliada e esquemática sobre os

resultados obtidos nos últimos anos sobre as respostas imunes desenvolvidas nos modelos murinos para a leishmaniose. Acreditamos que essa sistematização é importante no direcionamento de estudos e construção de conhecimentos futuros sobre a leishmaniose.

**Palavras-chave:** Leishmaniose; *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani/infantum*

## Abstract

Leishmaniasis are diseases caused by parasites of the genus *Leishmania sp.* The large number of studies in the construction of knowledge about the clinical forms of leishmaniasis, especially in the field of immunology contribute for studies and understanding of immune process involved in response to infections by *Leishmania*. Proposals for vaccines and drug treatments for this disease are conducted in mice models. Here, our aim was to make an enlarged and schematic review of the results obtained in recent years on the immune responses in murine models developed for leishmaniasis. We believe this systematization is important in directing studies and construction of future knowledge on leishmaniasis.

**Key-words:** Leishmaniasis; *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani/infantum*.

## Abreviaturas

**DC:** Célula dendrítica; **DTH:** hipersensibilidade do tipo tardio; **IFN:** Interferon; **IL-#:** Interleucina; **Ig#:** imunoglobulina; **iNOS:** Óxido nítrico sintase indutível; **LC:** Leishmaniose Cutânea; **LCL:** Leishmaniose cutânea localizada; **LM:** Leishmaniose mucocutânea; **LPG:** Lipofosfoliglicano; **LV:** Leishmaniose visceral; **KO:** *knockout*, **MCP-1:** Proteína 1 quimiotática de monócito; **MP:** Membrana periotrófica; **NETs:** Neutrophil Extracellular Traps; **NK:** Células exterminadoras naturais; **NO:** Óxido nítrico; **OMS:** Organização Mundial da Saúde; **PPG:** Proteofosfoliglicano; **PV:** Vacúolo parasitóforo; **RAG:** Gene de ativação de recombinação; **ROS:** Espécies reativas de oxigênio; **TGF:** Fator de crescimento transformante; **Th#:** Células T auxiliares do tipo #; **TLR:** Receptores do tipo Toll; **TNF:** Fator de necrose tumoral; **TNFR1:**

Receptor do tipo 1 de TNF; **Treg**: Células T reguladoras **Wt**: Tipo selvagem.

## INTRODUÇÃO

Leishmaniose é a denominação dada para doenças provocadas pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania* que, dependendo da espécie, podem produzir vários tipos de manifestações clínicas (locais e sistêmicas), considerado como um dos principais problemas de saúde pública mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. De acordo com dados recentes, as leishmanioses são endêmicas em 98 países de 5 continentes, onde o Brasil se destaca em relação à alta incidência (1;2). A Leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum, sendo que cerca de 95% dos casos ocorrem nas Américas, no Mediterrâneo e no leste e no centro da Ásia. O Brasil aparece entre os seis países em que dois terços dos novos casos anuais ocorrem. Há uma estimativa de 0,7 a 1,3 milhão de novos casos ao ano da forma cutânea. Em relação à forma mucocutânea (LM), cerca de 90% dos casos ocorrem na Bolívia, no Brasil e no Peru. Há uma estimativa de 200 a 400 mil novos casos e cerca de 30 a 40 mil óbitos por ano causados pela forma visceral (LV). Cerca de 90% desses novos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. A pobreza aumenta o risco para as leishmanioses devido às más condições de moradia, o que pode favorecer o surgimento de criadouros do vetor. Além disso, a construção em áreas silvestres facilita a domesticação do inseto e a má nutrição aumenta o risco de desenvolvimento de formas mais graves da doença (3;4).

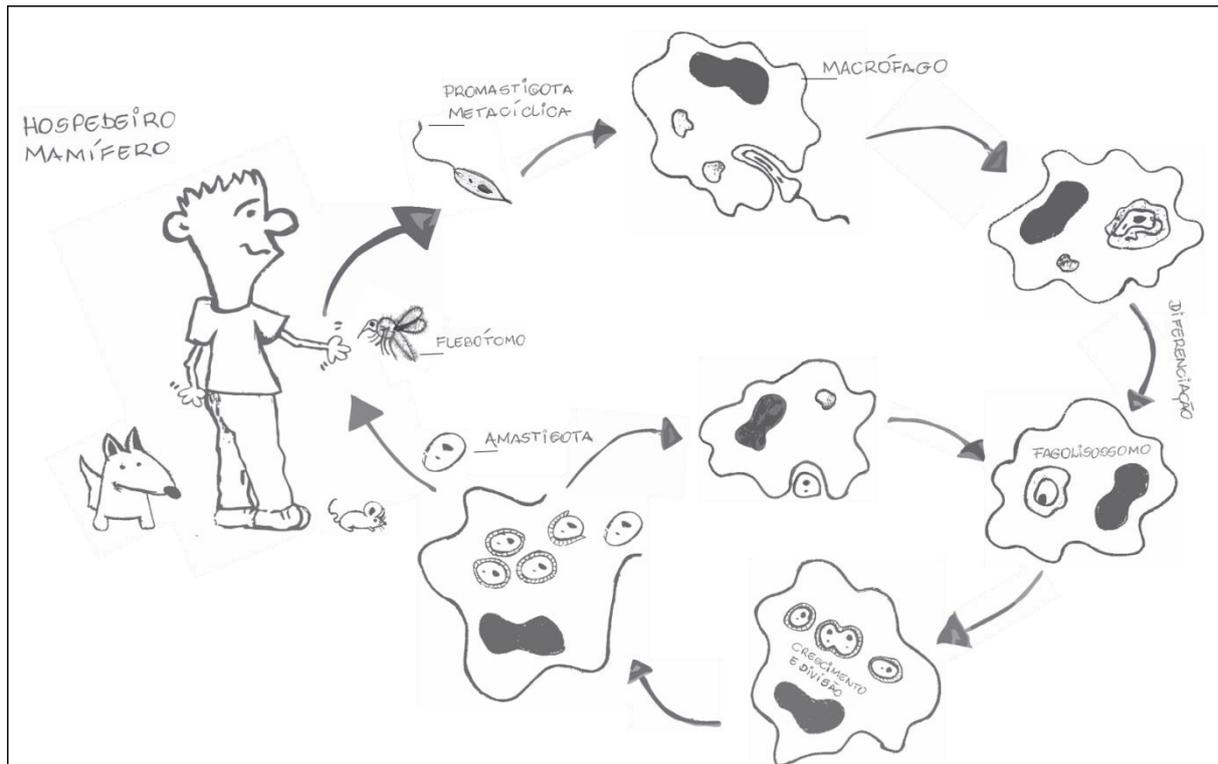
A transmissão da *Leishmania* ocorre quando há inóculo do parasito pelo vetor no hospedeiro vertebrado. As diversas espécies de vetores pertencem aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, sendo esses os responsáveis pela transmissão no Velho Mundo e Novo Mundo, respectivamente (5;6). São ao todo cerca de 20 espécies de *Leishmania*. Essas espécies, normalmente são relacionadas e agrupadas de acordo com as formas clínicas a elas associadas (tabela 1) (7).

Tabela 1 - Espécies de *Leishmania*. Adaptada de (WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Manifestação clínica	Espécie
<b>Velho Mundo, subgênero <i>Leishmania</i></b>	
Leishmaniose Visceral	<i>Leishmania donovani</i> e <i>Leishmania infantum</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>L. major</i> , <i>Leishmania tropica</i> e <i>Leishmania aethiopica</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania aethiopica</i>
<b>Novo Mundo, subgênero <i>Leishmania</i></b>	
Leishmaniose Visceral	<i>Leishmania infantum</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , <i>Leishmania pifanol</i> e <i>L. amazonensis</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania mexicana</i> e <i>L. amazonensis</i>
<b>Novo Mundo, subgênero <i>Viannia</i></b>	
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania brasiliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i> e <i>Leishmania peruviana</i>
Leishmaniose mucocutânea	<i>Leishmania brasiliensis</i> e <i>Leishmania panamensis</i>

São observadas duas formas distintas da *Leishmania* durante o seu ciclo de vida, promastigota e amastigota. A forma amastigota é caracterizada pela forma ovoide e sem flagelo aparente. É a forma intracelular encontrada no hospedeiro vertebrado, presente principalmente em células fagocitárias mononucleares. A forma promastigota é afilada, flagelar e móvel. Está presente no trato digestório do vetor invertebrado, sendo essa a forma infectante do parasito. Quando as fêmeas do vetor fazem o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, células contendo a forma amastigota do parasito são ingeridas. Após a ingestão, essas células se rompem no terço posterior do tubo digestório do vetor, liberando, então, as formas amastigotas (8-11). As amastigotas diferenciam-se em promastigotas, o que se dá, provavelmente, devido às diferenças de temperatura e pH entre os hospedeiros vertebrado e invertebrado (12;13). Ao longo de sucessivos processos de diferenciação em direção ao terço anterior do intestino do flebotomíneo as promastigotas externalizam e inserem seu flagelo ao intestino do vetor num processo dependente de um glicolípido chamado de lipofosfoglicano (LPG), (14). Os LPGs participam, também, dos processos de evasão do parasito no hospedeiro vertebrado, pois são capazes de bloquear a adesão

endotelial e a migração de monócitos/macrófagos e de células dendríticas através da alteração da expressão de moléculas de adesão e da quimiocina MCP-1. Isso acontece também através das PPGs (proteofosfoglicanos) nas amastigotas (15;16). Aproximadamente cinco dias após o repasto as promastigotas iniciam, então, a metaciclogênese e se diferenciam na forma promastigota metacíclica, menor e com maior mobilidade, o que torna o vetor invertebrado apto a infectar os hospedeiros vertebrados durante um novo repasto sanguíneo (13;17). A forma promastigota metacíclica é, então, a forma que infecta as células no hospedeiro. Uma vez estabelecido no interior da pele, o parasito aproveita-se dos componentes do sistema de complemento e, por meio da opsonofagocitose, garante a entrada silenciosa nos fagócitos (11;18;19). Uma vez dentro dessas células, os parasitos entram num processo de diferenciação para as formas amastigotas, que são as formas replicativas nas células do hospedeiro vertebrado (8;13). Durante a infecção natural por *L. major* no hospedeiro, ocorre o inóculo de cerca de 10 a 1000 promastigotas metacíclicas na pele juntamente com a saliva do inseto, a qual possui potentes fatores imunomodulatórios que facilitarão a invasão em fagócitos (17;20;21), levando ao surgimento de uma lesão cutânea localizada, que pode eventualmente ser curada de forma espontânea e levar a uma longa proteção a recidivas (figura 1) (22).



**Figura 1:** Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*. Durante o repasto sanguíneo, fêmeas de flebotomíneos ingerem fagócitos repletos de parasitos em seu fagossoma, os quais se encontram nas formas ovoides e sem flagelo aparente, denominadas amastigotas. Dentro do intestino médio ou posterior do vetor, as amastigotas são liberadas após o rompimento dos macrófagos ingeridos e se diferenciam progressivamente, até a conversão nas formas promastigotas metacíclicas, no intestino anterior do inseto. Nesse local, durante a picada no hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas são regurgitadas em baixa quantidade – entre 10 e 1000.

Em laboratório, as infecções experimentais murinas em sua maioria se restringem a injeção em alta dose de formas metacíclicas obtidas em cultura por meio de diversas vias, tais como: subcutânea, intravenosa, intradermal e intranasal (23). Entretanto, a descoberta de que algumas frações da saliva do vetor podem atuar como importantes imunomoduladores no organismo hospedeiro destacou a importância do uso do vetor em infecções laboratoriais ou o uso de proteínas salivares concomitante com os parasitos na seringa.

### O modelo de infecção por *Leishmania major*

A elucidação do modelo de suscetibilidade, representado pelo camundongo BALB/c, e do modelo de resistência, representado pelo camundongo

C57BL/6, com uma polarização de resposta do tipo T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), respectivamente, à infecção por *L. major* abriu caminho para a descrição do papel dos componentes celulares e humorais da resposta imunológica aos protozoários do gênero *Leishmania* (24;25).

*Um modelo de resistência à infecção: a linhagem de camundongos C57BL/6*

É sabido que camundongos com fundo genético C57BL/6 produzem baixos níveis de IL-4 quando infectados por diversos parasitos (26;27). Na ausência dessa citocina, os animais são capazes de resolver espontaneamente a lesão cutânea provocada durante infecções experimentais por *L. major*, o que é correlacionado com a presença de linfócitos TCD4+ polarizados no fenótipo do tipo Th1 com altos níveis de IFN- $\gamma$ . Essa polarização ocorre nos linfonodos drenantes do sítio inflamatório devido a altos níveis de IL-12 produzidos pelas células dendríticas já primadas no local da infecção. Os linfócitos Th1 são, assim, capazes de produzir altos níveis de IFN- $\gamma$ , o que atua diretamente sobre os macrófagos, as principais células infectadas pelo parasito (28). A combinação de dois sinais, IFN- $\gamma$  e TNF (29), resulta na ativação de uma população de macrófagos com atividade microbicida. O macrófago infectado e ativado produz, então, ânions superóxido e radicais de oxigênio e nitrogênio. Através do metabolismo do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS), há produção de óxido nítrico (NO), que mata o parasito intracelular. A expressão de iNOS é induzida por TNF.

*Um modelo de susceptibilidade à infecção: a linhagem de camundongos BALB/c*

De maneira oposta, a infecção por *L. major* em camundongos BALB/c provoca uma resposta em que o perfil de linfócitos TCD4+ está polarizado em Th2, pois se desenvolve em um ambiente com altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- $\gamma$ , caracterizando o modelo de infecção em BALB/c como um modelo de susceptibilidade. Os macrófagos ativados por IL-4, diferentemente de quando ativados por IFN- $\gamma$  e TNF, promovem a ativação de fatores de transcrição que irão aumentar a expressão da enzima Arginase I, a qual converte L-arginina em ornitina, um precursor

de poliaminas e do colágeno. Ao contrário do produto da ação da iNOS, a ornitina não mata o parasito. Assim, o macrófago ativado por IL-4 mantém um ambiente intracelular propício para a replicação do parasito (30;31). A relação inversa da expressão gênica de IFN- $\gamma$  e IL-4 nos dois modelos constitui as bases para a formação das respostas celular e humoral tão distintas às infecções pelo mesmo parasito nos dois camundongos. Já em humanos, não são detectados altos níveis de IL-4 em pacientes com leishmaniose cutânea difusa, sugerindo que a resposta Th2 pode ser menos importante para a severidade da doença que em camundongos (32).

Num processo independente da resposta do tipo Th1 ou Th2, a citocina IL-10 inibe a produção de NO por macrófagos infectados. Quando os macrófagos fagocitam parasitos opsonizados por IgG do hospedeiro, esses são induzidos a produzirem maiores quantidades de IL-10, o que, mais uma vez, assim como a IL-4 e/ou IL-13, favorece a proliferação do parasito (33;34). Ou seja, há outros fatores além da polarização para Th1 e Th2 que favorecem os perfis de resistência e suscetibilidade à infecção por *L. major*.

O entendimento desses dois modelos foi de extrema importância para a compreensão dos papéis dos componentes da resposta imune durante a infecção por *Leishmania*, seja na exacerbação ou na resolução da inflamação.

### **O modelo de infecção por *Leishmania amazonensis***

A polarização Th1/Th2 e seu papel no desenvolvimento de modelos de resistência e suscetibilidade, vistos na infecção por *L. major*, servem de parâmetro para os estudos acerca da relação entre resposta imunológica do hospedeiro e os parasitos do gênero *Leishmania*. Porém esse papel protetor e indutor de suscetibilidade não se aplica a todos os hospedeiros e nem a todas as espécies de parasitos (35;35;36). Quase todas as linhagens de camundongos, exceto a C3H/HeJ, são susceptíveis à *L. amazonensis*, até mesmo as que são modelo de resistência a outras espécies, como a linhagem C57BL6 frente à infecção por *L. major*. Os hospedeiros desenvolvem lesões progressivas com formação de vacúolo

parasitóforo (PV) nas células infectadas e alta e persistente carga parasitária (37-39). Esses modelos de suscetibilidade não estão, necessariamente, ligados a uma polarização do tipo Th2 e/ou uma alta produção de IL-4, mas sim a uma baixa quantidade de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17, sendo que esse cenário inicial pode ser crucial para a sobrevivência do parasito e para a manutenção da carga parasitária (36). Macrófagos infectados com *L. amazonensis*, mesmo na presença de IFN- $\gamma$  e TNF, não conseguem eliminar os parasitos. Isso acontece, provavelmente, pois no caso dessa espécie há formação do PV, o que pode comprometer a ação leishmanicida do NO e das espécies reativas de oxigênio (ROS) (40). Recentemente, relatou-se que a infecção por *L. amazonensis* dificulta a migração de células dendríticas do sítio de infecção para os linfonodos drenantes (41), mas há um grande acúmulo de células de Langherans (42). Além de níveis baixos na produção de citocinas, como a IL-12, há, também, um comprometimento na expressão da cadeia  $\beta 2$  de seu receptor (43;44).

Ao contrário do que acontece na infecção por *L. major*, na infecção por *L. amazonensis* os neutrófilos apresentam um papel protetor. Camundongos BALB/c quando infectados por *L. amazonensis* tornam-se mais susceptíveis quando há depleção de neutrófilos, num mecanismo que parece ser dependente de IL-10 e IL-17 (45). Já em humanos, neutrófilos infectados por formas promastigotas do parasito, produzem NETs (neutrophil extracellular traps) que eliminam a *Leishmania* (46;47). Como são as primeiras células a chegarem ao sítio de infecção, os neutrófilos apresentam papel importante no controle do parasitismo nos tempos iniciais de infecção (47;48).

Outro ponto bastante distinto durante a infecção por *L. amazonensis* é o papel desempenhado pela citocina IFN- $\gamma$ . Na infecção por *L. major*, o IFN- $\gamma$  tem papel crucial na ativação de macrófagos, na morte do parasito e na resolução da infecção, porém em baixas doses o IFN- $\gamma$  pode favorecer a proliferação das formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos infectados *in vitro*, mesmo estimulando a morte das formas promastigotas (49). Em um estudo recente, foi demonstrado que além dos macrófagos, aparentemente a *L. amazonensis* é também internalizada pelas células fagocíticas derivadas de B-1, sendo que essas células

apresentaram uma maior quantidade de parasitos internalizados quando comparadas com culturas de macrófagos peritoneais e derivados de medula (50). As células T reguladoras parecem ter um papel protetor durante a infecção por *L. amazonensis*, porém sua ação protetora não foi associada à produção de TGF- $\beta$  e IL-10 (51). Ainda é bastante controversa a forma como o sistema imunológico responde à infecção por *L. amazonensis*, já que papéis clássicos descritos para o modelo na infecção por *L. major*, não se aplicam ao modelo de *L. amazonensis*.

### **O modelo de infecção por *Leishmania braziliensis***

No Brasil, a presença de leishmaniose cutânea está frequentemente associada à *L. braziliensis*, devido a alta incidência dessa espécie de parasito (52). Pelo menos três manifestações da forma cutânea são relacionadas à *L. braziliensis*, incluindo desde a forma subclínica – em que se correlaciona uma fraca hipersensibilidade celular à ausência de grandes lesões – até a leishmaniose cutânea localizada (LCL) e a leishmaniose mucocutânea (LM).

No caso das lesões provocadas por *L. braziliensis*, um fato intrigante é que elas são caracterizadas por uma forte resposta celular do tipo Th1 induzida por alta produção de mediadores pró- inflamatórios como TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17, ainda que a carga parasitária nas lesões seja significativamente baixa (53-57). Esse, inclusive, parece ser o fator que diferencia a resposta à *L. braziliensis* da resposta frente às outras espécies relacionadas às formas clínicas da leishmaniose visceral e da leishmaniose difusa (58;59). Um estudo comparativo em camundongos BALB/C sugere que diferentes populações de células dendríticas poderiam ser determinantes em induzir respostas específicas às diferentes espécies de *Leishmania*: enquanto células dendríticas dermais contribuem para desenvolver um perfil Th1 primando linfócitos T na infecção por *L. braziliensis*, células de Langerhans contribuiriam para impedir a expressão de Th1 em *L. amazonensis* (60).

Uma clara deficiência na regulação da inflamação por meio baixos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  parece ser um dos fatores-chave no agravamento da

patologia induzida por essa espécie de parasito, que pode culminar no desenvolvimento de lesões tardias na mucosa. Tais lesões geralmente se manifestam algum tempo após as lesões primárias na pele (ou mesmo concomitante a elas) e têm sido fortemente associadas a uma hiperatividade dos linfócitos T (a despeito do seu papel protetor na indução de uma resposta Th1 durante a infecção por *L.major*) – em especial a atividade citotóxica: a presença de granzima B é correlacionada com a severidade da lesão (61-64). Neutrófilos também aparentam exercer importante função patológica em pacientes com lesões de mucosa devido a sua correlação nas áreas de nasofaringe de pacientes, sendo que há uma redução significativa na quantidade dessas células após tratamento com fármacos anti-leishmania (65). Além disso, um importante estudo comparativo entre pacientes acometidos com a forma cutânea e mucocutânea correlaciona as formas amastigotas em certas lesões de mucosa à presença de um retrovírus, que por meio da indução de maior expressão de componentes pró-inflamatórios provoca a subversão do sistema imunológico (66).

A dificuldade em se obter uma boa correspondência entre a resposta à infecção por *L. braziliensis* no ser humano e no animal tem tornado difícil estudar essa manifestação em laboratório. A maioria das linhagens de camundongos comumente utilizados nos modelos com *L. major* apresentam resposta altamente resistente em relação a *L. braziliensis*, com lesões cutâneas pouco severas ou mesmo ausência delas, como observado em C57BL/6 e C3H/HeJ (67). No caso do BALB/c que claramente polariza a uma resposta de susceptibilidade em *L. major*, observa-se um perfil de resposta imune relativamente variado devido aos polimorfismos entre as cepas de *L. braziliensis* (68). A primeira tentativa de desenvolver um modelo experimental para leishmaniose mucocutânea partiu de Barral (69), a partir do inóculo de *L. major* em camundongos de uma linhagem híbrida entre C57BL/6 e BALB/c. Observou-se nos animais infectados capacidade de visceralização e desenvolvimento de lesões nas regiões nasais, porém a grande quantidade de parasitos isolados bem como a espécie de parasito utilizada tornou esse modelo pouco adequado (69).

Uma boa alternativa para tentar se contornar os problemas com modelos

experimentais em *L. braziliensis* tem sido utilizar camundongos *Knockouts* (KO). Estudos a partir da infecção por esse parasito em camundongos Rag1 KO e TNFR1 KO evidenciam indução de lesões mais severas que se correlacionam com os aspectos imunopatológicos da doença humana (62;70). Adicionalmente, a reconstituição de camundongos Rag1 KO com linfócitos T CD8+ foi capaz de recrutar neutrófilos produtores de altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF, o que contribuiu para o agravamento das lesões. Entretanto, os níveis de parasitos no local ainda eram relativamente altos (62). Dois trabalhos correlacionam a ausência de apoptose no camundongo TNFR1 com a presença de um infiltrado inflamatório na pele rico em células T CD8+, células Ly6G+ e a liberação contínua de mediadores pró-inflamatórios em um perfil similar ao das lesões de mucosa humana, as quais se encontram repletas de células T CD8+ e neutrófilos. Entretanto, alguns problemas como a espécie de parasito utilizada e a ausência de acometimento da mucosa inviabilizam a sua utilização como modelo para estudo da leishmaniose mucocutânea (70;71).

## O modelo de infecção em leishmaniose visceral

O controle da infecção humana por *Leishmania infantum* (novo mundo) e *Leishmania donovani* (velho mundo) também está associado à capacidade de se desenvolver uma resposta no padrão Th1, que leva à produção de citocinas como IFN- $\gamma$  ou TNF, culminando na ativação clássica de macrófagos para matar o parasito (72;73). A exemplo do que ocorre com as demais espécies de *Leishmania*, *L. infantum* e *L. donovani* também podem desenvolver formas assintomáticas dependendo de diversos fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro: esses indivíduos produzem intensa resposta DTH (hipersensibilidade do tipo tardio) e alta produção de IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  por células mononucleares de sangue periférico (74;75), o que não ocorre em pacientes que desenvolvem a forma visceral da doença. A ausência da produção de IL-2 e de IFN- $\gamma$  juntamente com elevados níveis séricos de IL-10, são características de pacientes que desenvolvem LV por *L. infantum* ou *L. donovani*. (56;57). Além disso, citocinas do padrão Th2 tais como IL-4 e IL-13, estão relacionadas com susceptibilidade e desenvolvimento de LV em humanos, via inibição de células efetoras do sistema imune que levam à ativação

clássica de macrófagos (76;77). Juntos, esses dados sugerem que o prejuízo na capacidade microbicida dos macrófagos poderia favorecer a disseminação do parasito e o acometimento de diversos órgãos.

O papel da IL-17 em *Leishmania* ainda não é muito bem elucidado, porem estudos em *L. donovani* e *L. infantum* correlacionam a presença de linfócitos Th17 liberando em IL-17, a qual, em sinergismo com IFN- $\gamma$  (78) ou IL-22 (79) exerce papel protetor, o que não acontece em situações em que ela está ausente. Em contrapartida, trabalhos relacionam a gravidade da doença à ação das células Treg (células T reguladoras) obtidas das lesões, as quais estariam exercendo efeito supressor sobre os linfócitos Th1 por meio de mecanismos reguladores, como a liberação de IL-10 e TGF- $\beta$  (80).

Animais BALB/c e C57BL/6 são hospedeiros experimentais importantes para estudos *in vivo* e testes vacinais, entretanto a infecção murina por *L. donovani* não reproduz a doença humana. Esses animais conseguem controlar satisfatoriamente a carga parasitária após a quinta semana de infecção, a partir da montagem do padrão via Th1 clássico em que a liberação de IFN- $\gamma$  promove a ativação de macrófagos a produzirem NO. Portanto, o modelo murinho de infecção por *L. donovani* parece estar mais próximo de reproduzir manifestações subclínicas que a LV propriamente (81).

## Considerações finais

Os modelos murinos são extremamente versáteis e de manejo mais fácil quando comparado a outros modelos animais, como cães, hamsters, dentre outros. Isso facilita os estudos dos mecanismos para diversas patologias, assim como o direcionamento da resposta imune às infecções, aos processos inflamatórios e ao reparo tecidual. No caso do estudo das leishmanioses, foi em modelos murinos que se elucidou a importância das células T e da sua polarização em Th1 e Th2 na infecção por *L. major*, juntamente com a descrição do papel do IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12 na cura das lesões em camundongos resistentes, devido à ativação clássica de macrófagos e à consequente produção de NO. Ao abrir espaço para a

descrição da resposta imune à *L. major*, o modelo da dicotomia Th1/Th2 (C57BL/6 x BALB/c) criou condições para o estudo das infecções pelas outras espécies de *Leishmania* e das diversas manifestações clínicas associadas às leishmanioses. Nosso grupo desenvolveu um modelo de infecção crônica por *L. major*, utilizando um camundongo *knockout* para o receptor 1 do TNF (TNFR1KO), sendo esse um modelo que se aproximou bastante das condições clínicas que apresenta de pacientes com leishmaniose que desenvolvem lesões mucocutânea (82). Além dos modelos de infecção por *L. major*, nossos dados descrevem o papel importante dos neutrófilos e a ação dual do IFN-  $\gamma$  na infecção por *L. amazonensis* (45;83). E foi em um modelo de infecção por *L. amazonensis* que descrevemos a ausência de receptores para a citocina pró-inflamatória IL-18 nos macrófagos murinos (84). No momento buscamos desenvolver o modelo para leishmaniose mucocutânea com *L. braziliensis* em TNFR1KO e entender os mecanismos de migração do parasito e formação de lesões em mucosa, assim como descrever a importância de linfócitos TCD4+ ativados por IL-18 na manutenção de lesões na infecção por *L. amazonensis*.

O desenvolvimento desses diversos modelos, além de elucidar a relação parasito-hospedeiro, assim como a resposta imune às diversas espécies de *Leishmania*, favorece, também, o entendimento das funções das células que compõem esse tão complexo sistema. Cabe salientar que, como na maioria das vezes os camundongos são isogênicos é bastante complicado traçar semelhanças com as infecções humanas, que são bastante heterogêneas, dado a alta variabilidade genética das populações. Cada modelo murino tem como finalidade contribuir na elucidação do mecanismo e perfil das respostas imunes em processos inflamatórios e infecciosos. Por esse motivo é que são gerados camundongos knockouts e Cre-Lox, a fim de descrever os efeitos da ausência ou aumento de moléculas específicas e não necessariamente mimetizar o que acontece em humanos. Adicionalmente, o conhecimento acumulado pela utilização desses animais em modelos de infecção por *Leishmania* pode auxiliar no desenvolvimento de imunoterapias para leishmaniose.

## Referências bibliográficas

1. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012;7(5):e35671.
2. Salam N, Al-Shaqha WM, Azzi A. Leishmaniasis in the Middle East: Incidence and Epidemiology. *PLoS Negl Trop Dis* 2014 Oct;8(10):e3208.
3. WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases, World Health Organization. Control of the leishmaniases report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. Geneva: World Health Organization; 2010.
4. Hotez PJ, American Society for Microbiology. Forgotten people, forgotten diseases the neglected tropical diseases and their impact on global health and development. 2nd ed ed. Washington, DC: ASM Press; 2013.
5. Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996 Sep;14(5):417-23.
6. Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 2004 Jul 22;430(6998):463-7.
7. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004 May;99(3):239-51.
8. Bajenoff M, Breart B, Huang AY, Qi H, Cazareth J, Braud VM, et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 2006 Mar 20;203(3):619-31.
9. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 2007 Aug;37(10):1097-106.

10. Rogers ME, Bates PA. Leishmania manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog* 2007 Jun;3(6):e91.
11. Schaible UE, Schlesinger PH, Steinberg TH, Mangel WF, Kobayashi T, Russell DG. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *J Cell Sci* 1999 Mar;112 ( Pt 5):681-93.
12. Campbell SM, Rainey PM. *Leishmania pifanoi*: kinetics of messenger RNA expression during amastigote to promastigote transformation in vitro. *Exp Parasitol* 1993 Aug;77(1):1-12.
13. Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 1984 Mar 30;223(4643):1417-9.
14. Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 1992 Jun 26;256(5065):1812-5.
15. Lo SK, Bovis L, Matura R, Zhu B, He S, Lum H, et al. *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. *J Immunol* 1998 Feb 15;160(4):1857-65.
16. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005 Oct 29;366(9496):1561-77.
17. Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 1989 Jul;69(1):100-3.
18. Mosser DM, Brittingham A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* 1997;115 Suppl:S9-23.
19. Dominguez M, Moreno I, Aizpurua C, Torano A. Early mechanisms of

- Leishmania infection in human blood. *Microbes Infect* 2003 May;5(6):507-13.
20. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 1998 Nov 16;188(10):1941-53.
  21. Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* 2000 Jul 15;165(2):969-77.
  22. Warburg A, Schlein Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg* 1986 Sep;35(5):926-30.
  23. Nabors GS, Nolan T, Croop W, Li J, Farrell JP. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunol* 1995 Nov;17(11):569-79.
  24. Locksley RM, Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Gardner KD, Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1987 Sep;138(5):744-9.
  25. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* 2005 Jul 1;175(1):5-14.
  26. Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 1989 Jan

- 1;169(1):59-72.
27. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 2004 Nov;22(5):460-6.
  28. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008 Dec;8(12):958-69.
  29. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008 Feb;117(2):244-79.
  30. Kreider T, Anthony RM, Urban JF, Jr., Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol* 2007 Aug;19(4):448-53.
  31. Loke P, Gallagher I, Nair MG, Zang X, Brombacher F, Mohrs M, et al. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *J Immunol* 2007 Sep 15;179(6):3926-36.
  32. Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 2000 Jul 1;165(1):364-72.
  33. Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 2001 Jan 15;166(2):1141-7.
  34. Noben-Trauth N, Lira R, Nagase H, Paul WE, Sacks DL. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J Immunol* 2003 May 15;170(10):5152-8.
  35. McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev* 2004 Oct;201:206-24.

36. Ji J, Sun J, Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 2003 Aug;71(8):4278-88.
37. Qi H, Popov V, Soong L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. *J Immunol* 2001 Oct 15;167(8):4534-42.
38. Soong L, Chang CH, Sun J, Longley BJ, Jr., Ruddle NH, Flavell RA, et al. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 1997 Jun 1;158(11):5374-83.
39. Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 1993 Jul;61(7):2952-9.
40. Wilson J, Huynh C, Kennedy KA, Ward DM, Kaplan J, Aderem A, et al. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. *PLoS Pathog* 2008 Oct;4(10):e1000179.
41. Hermida MD, Doria PG, Taguchi AM, Mengel JO, dos-Santos W. *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC Infect Dis* 2014;14:450.
42. Carvalho AK, Carvalho K, Passero LF, Sousa MG, da Matta VL, Gomes CM, et al. Differential Recruitment of Dendritic Cells Subsets to Lymph Nodes Correlates with a Protective or Permissive T-Cell Response during *Leishmania (Viannia) Braziliensis* or *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Infection. *Mediators Inflamm* 2016;2016:7068287.
43. Heinzl FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 1993 May 1;177(5):1505-9.
44. Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-independent inhibition of IL-12

- responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 2000 Jul 1;165(1):364-72.
45. Sousa LM, Carneiro MB, Resende ME, Martins LS, dos Santos LM, Vaz LG, et al. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol* 2014 Jan;36(1):13-31.
  46. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Apr 21;106(16):6748-53.
  47. Guimaraes-Costa AB, DeSouza-Vieira TS, Paletta-Silva R, Freitas-Mesquita AL, Meyer-Fernandes JR, Saraiva EM. 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. *Infect Immun* 2014 Apr;82(4):1732-40.
  48. Carlsen ED, Hay C, Henard CA, Popov V, Garg NJ, Soong L. *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infect Immun* 2013 Nov;81(11):3966-74.
  49. Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2004 Feb;72(2):988-95.
  50. Geraldo MM, Costa CR, Barbosa FM, Vivanco BC, Gonzaga WF, Novaes E Brito RR, et al. In vivo and in vitro phagocytosis of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes by B-1 cells. *Parasite Immunol* 2016 Apr 16.
  51. Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 2005 Jun 1;174(11):7147-53.

52. Amato VS, de Andrade HF, Duarte MI. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop* 2003 Jan;85(1):39-49.
53. Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonca SC, Coutinho SG. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996 Mar;91(2):225-9.
54. Gul HC, Tosun F, Karakas A, Koru O, Onguru O, Mert G, et al. A case of mucosal leishmaniasis: Mimicking intranasal tumor with perforation of septum. *J Microbiol Immunol Infect* 2013 Dec 30.
55. Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de AJ, Dos Santos WL, Clarencio J, et al. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol* 2010 Oct;40(10):2830-6.
56. de Camargo RA, Nicodemo AC, Sumi DV, Gebrim EM, Tuon FF, de Camargo LM, et al. Facial structure alterations and abnormalities of the paranasal sinuses on multidetector computed tomography scans of patients with treated mucosal leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2014 Jul;8(7):e3001.
57. Gomes CM, Avila LR, Pinto SA, Duarte FB, Pereira LI, Abrahamsohn IA, et al. *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1beta, IL-6, IL-10 and TGF-beta by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. *Parasite Immunol* 2014 May;36(5):225-31.
58. Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimaraes LH, Jesus AR, et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol* 2006 Jan;63(1):70-8.
59. Dantas ML, de Oliveira JM, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Guimaraes LH, et al. Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. *Mem*

Inst Oswaldo Cruz 2014 Apr;109(2):202-9.

60. Carvalho AK, Carvalho K, Passero LF, Sousa MG, da Matta VL, Gomes CM, et al. Differential Recruitment of Dendritic Cells Subsets to Lymph Nodes Correlates with a Protective or Permissive T-Cell Response during *Leishmania (Viannia) Braziliensis* or *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Infection. *Mediators Inflamm* 2016;2016:7068287.
61. Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2007 Dec;29(12):671-8.
62. Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog* 2013;9(7):e1003504.
63. Santos CS, Boaventura V, Ribeiro CC, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, et al. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFNgamma(+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 2013 Jun;133(6):1533-40.
64. Dantas ML, Oliveira JC, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Machado P, et al. CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013 Nov;46(6):728-34.
65. Guerreiro JB, Cruz AA, Barral A, Lessa HA, Rocha H, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: quantitative nasal cytology as a marker of disease activity and indicator of healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000 Jan;109(1):89-94.
66. Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* 2011 Feb 11;331(6018):775-8.
67. Childs GE, Lightner LK, McKinney L, Groves MG, Price EE, Hendricks LD. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*,

- L. mexicana, and L. aethiopica. *Ann Trop Med Parasitol* 1984 Feb;78(1):25-34.
68. DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 1998 Feb;66(2):827-9.
69. Barral A, Petersen EA, Sacks DL, Neva FA. Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 1983 Mar;32(2):277-85.
70. Oliveira CF, Manzoni-de-Almeida D, Mello PS, Natale CC, Santiago HC, Miranda LS, et al. Characterization of chronic cutaneous lesions from TNF-receptor-1-deficient mice infected by *Leishmania major*. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:865708.
71. Vieira LQ, Goldschmidt M, Nashleanas M, Pfeffer K, Mak T, Scott P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J Immunol* 1996 Jul 15;157(2):827-35.
72. Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1981 Oct;127(4):1438-43.
73. Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *J Clin Invest* 1983 Oct;72(4):1506-10.
74. Carvalho EM, Badaro R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD, Jr. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 1985 Dec;76(6):2066-9.
75. Sacks DL, Perkins PV. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 1985 May;34(3):456-9.

76. Babaloo Z, Kaye PM, Eslami MB. Interleukin-13 in Iranian patients with visceral leishmaniasis: relationship to other Th2 and Th1 cytokines. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001 Jan;95(1):85-8.
77. Thakur CP, Mitra DK, Narayan S. Skewing of cytokine profiles towards T helper cell type 2 response in visceral leishmaniasis patients unresponsive to sodium antimony gluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003 Jul;97(4):409-12.
78. Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Junior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie M, et al. IL-17A ACTS SYNERGISTICALLY WITH IFN-gamma TO PROMOTE PROTECTION AGAINST *Leishmania infantum* INFECTION. *J Infect Dis* 2014 Oct 1.
79. Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest* 2009 Aug;119(8):2379-87.
80. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2007 Feb 19;204(2):285-97.
81. Melby PC, Tabares A, Restrepo BI, Cardona AE, McGuff HS, Teale JM. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol* 2001 Sep;99(1):17-25.
82. Oliveira CF, Manzoni-de-Almeida D, Mello PS, Natale CC, Santiago HC, Miranda LS, et al. Characterization of chronic cutaneous lesions from TNF-receptor-1-deficient mice infected by *Leishmania major*. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:865708.
83. Carneiro MB, Lopes ME, Vaz LG, Sousa LM, dos Santos LM, de Souza CC, et al. IFN-gamma-Dependent Recruitment of CD4(+) T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania*

amazonensis Infection. J Interferon Cytokine Res 2015 Dec;35(12):935-47.

84. Sousa LM, Carneiro MB, dos Santos LM, Natale CC, Resende ME, Mosser DM, et al. IL-18 contributes to susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection by macrophage-independent mechanisms. Cytokine 2015 Aug;74(2):327-30.