



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**TRABALHO DE DISSERTAÇÃO**

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES**  
***TOLL-LIKE 2 E TOLL-LIKE 4* EM MONÓCITOS DE**  
**PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

**MESTRANDA**

**LUDMILA PORTO MENDES POLARI**

Salvador, Bahia

2013

**LUDMILA PORTO MENDES POLARI**

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES  
*TOLL-LIKE 2* E *TOLL-LIKE 4* EM MONÓCITOS DE  
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Olívia A. Bacellar

Salvador, BA

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

P762 Polari, Ludmila Porto Mendes

Caracterização da expressão dos receptores toll-like 2 e toll-like 4 em monócitos de pacientes com leishmaniose tegumentar / Ludmila Porto Mendes Polari. – Salvador, 2013.

106 f.

Orientadora: Profª Drª Olívia A. Bacellar

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-graduação em Imunologia, 2013.

1. Receptores toll-like 2 e 4. 2. Leishmaniose tegumentar. 3. *L. braziliensis* 4. Monócitos. I. Bacellar, Olívia Amado. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.993.161

À luz da minha vida, minha filha Maria Eduarda, e ao meu marido Rômulo, que me motivam cada dia a querer sempre mais e melhor.

Ao meu pai Eduardo (*in memoriam*), que me ensinou a viver com amor, e por fazer parte de quem sou. Não há um dia em que não pense em você.

À minha mãe Edna, por ser sempre meu porto seguro, meu alicerce. Todas as palavras não seriam suficientes para agradecer. Amo-te.

Ao meu padrasto Aldenor, por fazer parte da minha vida, por todo o carinho, todo o apoio e todo o amor.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelas horas de alegria, pelo apoio e por adoçarem minha vida.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA  
LUDMILA PORTO MENDES POLARI

Aos trinta dias do mês de agosto do ano de dois mil e treze às quatorze horas no Auditório III - 2º andar no Instituto de Ciências da Saúde, a Banca Examinadora composta das Professoras: Dra. Maria Olivia Amado Ramos Bacellar, Orientadora, Dra. Camila Indiani de Oliveira, Dra. Deboraci Brito Prates se reúne em sessão pública com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: "Caracterização da Expressão dos Receptores Toll-Like 2 e Toll-Like 4 em Monócitos de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar" da Mestranda Ludmila Porto Mendes Polari. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a pós-graduanda teve a sua defesa de Dissertação APROVADA, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca Examinadora, pela Mestranda e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Salvador, 30 de agosto de 2013.

Profa. Maria Olivia Amado Ramos Bacellar  
Orientadora

Profa. Camila Indiani de Oliveira  
Banca Examinadora

Profa. Deboraci Brito Prates  
Banca Examinadora

Ludmila Porto Mendes Polari  
Mestranda

Profa. Dra. Silvia Lima Costa  
Coordenadora do PPGIm  
ICS-UFBA

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Dra. Olívia Bacellar, não só pela orientação, mas também pela confiança e paciência, pelo exemplo de pesquisadora e pessoa, por ter-me oferecido esta oportunidade e aberto às portas do Serviço de Imunologia. Serei sempre grata.

Ao Dr. Edgar M. de Carvalho, alvo de grande admiração e respeito, por todos os ensinamentos e orientações.

Ao Dr. Lucas Carvalho e Dra. Sara Passos, por terem me ensinado e me acompanhado nos experimentos com Citometria de Fluxo. Pela ajuda e incentivo na realização deste trabalho.

À equipe médica e pesquisadores que viajam até Corte de Pedra e realizam um trabalho magnífico com os pacientes e nos trazem as amostras, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos funcionários do posto de Saúde de Corte de Pedra, por todo o trabalho e colaboração com nosso grupo.

Aos pacientes e familiares da área endêmica, por participarem desta pesquisa com tanta generosidade e disposição.

Aos amigos do laboratório de Imunorregulação, em especial a Aline, Jacilara, Walker e Pedro Paulo, pela convivência, incentivo e cumplicidade.

À todos os médicos, pesquisadores, estudantes e funcionários do Serviço de Imunologia (SIM) do Hospital Universitário Edgard Santos, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos participantes da banca examinadora por doarem seu tempo para o enriquecimento deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Imunologia.

À todos, meus sinceros agradecimentos, certa que esse apoio, esse contato, toda essa experiência, tanto profissional quanto emocional, foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, assim como para o meu desenvolvimento pessoal.

**“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.**

*Marthin Luther King*

## I. RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES *TOLL-LIKE 2* E *TOLL-LIKE 4* EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

**Introdução.** A leishmaniose cutânea (LC) causada por *Leishmania braziliensis* é caracterizada por forte resposta imune do tipo Th1, importante para a eliminação do parasito, mas associada com o desenvolvimento das lesões. Apesar dos vários estudos sobre a imunologia da LC, vários aspectos sobre os estágios iniciais da infecção permanecem desconhecidos. Os receptores *toll-like* (TLR) são expressos em diversos tipos celulares, como monócitos, e a ativação desses receptores está associada à síntese de citocinas pró-inflamatórias, que iniciam a resposta imune inata. Entretanto, ainda não se tem certeza do papel dos TLRs na LC humana.

**Objetivo:** Caracterizar a expressão dos TLRs 2 e 4 nas subpopulações de monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea. **Materiais e métodos:** As

expressões dos TLRs 2 e 4 e de TNF e de IL-10 foram avaliadas por citometria de fluxo nas subpopulações de monócitos de 37 pacientes com LC e 21 indivíduos saudáveis (CS), *ex-vivo* e após infecção *in vitro* com *L. braziliensis* marcados com CFSE. **Resultados:** A expressão dos TLRs 2 e 4, *ex-vivo* e após infecção com *L. braziliensis*, foi maior nos pacientes com LC quando comparada com CS. A expressão desses receptores é maior nos monócitos infectados com *L. braziliensis* em relação aos não infectados, e também é maior nas células CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> (monócitos intermediários) quando comparado com células CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> (monócitos clássicos) e CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> (monócitos não-clássicos). A expressão intracelular de TNF e de IL-10 foi maior nos monócitos CD14<sup>high</sup> (clássicos e intermediários) infectados com *L. braziliensis* que expressam os TLRs 2 e 4.

**Conclusão:** O aumento na expressão dos TLRs 2 e 4 em monócitos de pacientes com LC, após infecção com *L. braziliensis*, está associado ao aumento intracelular de TNF, sugerindo que a ativação desses receptores pode contribuir para a forte resposta inflamatória observada na leishmaniose tegumentar.

**Palavras-chave:** Receptores *Toll-Like 2* e 4; Leishmaniose Tegumentar; *L. braziliensis*; Subpopulações de Monócitos.

## II. ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF TOLL-LIKE RECEPTORS 2 AND 4 EXPRESSION IN MONOCYTES FROM PATIENTS WITH CUTANEOUS LEISHMANIASIS

**Introduction:** Cutaneous Leishmaniasis (CL) caused by *Leishmania braziliensis* is characterized by a strong Th1 immune response that is important for parasite elimination, but also is associated with the development of lesions. Despite several studies on the immunology of LC, several aspects of the early stages of infection remain unknown. The toll-like receptors (TLR), are expressed in various cell types, such as monocytes. Activation of these receptors leads to the synthesis of cytokines, initiating the innate immune response. However, the role of these receptors in human CL caused by *L. braziliensis* is still unknown. **Objective:** To characterize the expression of TLR2 and TLR4 on monocyte subsets from CL patients. **Materials and Methods:** The expression of TLR2 and TLR4, TNF and IL-10 was evaluated by flow cytometry in monocytes subsets from 37 patients with CL and 21 healthy controls (HC), *ex vivo* and after infection *in vitro* with *L. braziliensis* stained with CFSE. **Results:** The TLRs 2 and 4 expression was higher in CL patients, *ex vivo* and after infection with *L. braziliensis*, when compared to HC. The expression of these receptors is higher in monocytes infected with *L. braziliensis* compared to uninfected monocytes. The TLR2 and TLR4 expression were higher in CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> cells (intermediate monocytes) as compared to classical (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>) and non-classical (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) monocytes. The intracellular expression of TNF and IL-10 was higher in CD14<sup>high</sup> monocytes (classical and intermediates) infected with *L. braziliensis* that express TLRs 2 and 4, compared to those who do not express such receptors. **Conclusion:** The increased expression of TLRs on monocytes from CL patients after infection with *L. braziliensis* is associated with increased intracellular TNF, suggesting that activation of these receptors may contribute to the strong inflammatory response observed in cutaneous leishmaniasis.

**Key words:** Toll Like Receptors; Cutaneous Leishmaniasis; *L. braziliensis*; Monocytes Subsets.

### III. LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Nomenclatura dos monócitos no sangue .....	10
<b>Figura 2</b> - Princípios da sinalização dos TLRs.....	17
<b>Figura 3</b> - Via de ativação do TLR e MyD88 na infecção por <i>Leishmania</i> .....	19
<b>Figura 4</b> - Fluxograma ilustrativo do estudo.....	28
<b>Figura 5</b> - Expressão <i>ex-vivo</i> dos receptores <i>toll-like</i> 2 e 4 nos monócitos de pacientes com LC e indivíduos saudios .....	37
<b>Figura 6</b> - Expressão <i>ex-vivo</i> dos TLRs 2 e 4 em monócitos humanos.....	38
<b>Figura 7</b> - Expressão <i>ex-vivo</i> dos receptores <i>toll-like</i> 2 e 4 nas subpopulações de monócitos de pacientes com LC e indivíduos saudios .....	41
<b>Figura 8</b> - Expressão <i>ex-vivo</i> de TLRs 2 e 4 nas subpopulações de monócitos.....	42
<b>Figura 9</b> - Expressão <i>ex-vivo</i> dos receptores <i>toll-like</i> 2 e 4 nos monócitos intermediários de pacientes com LC e indivíduos saudios.....	43
<b>Figura 10</b> - Representação gráfica da estratégia utilizada para identificar a expressão dos receptores <i>toll-like</i> 2 e 4 nos monócitos infectados por <i>L. braziliensis</i> .....	45
<b>Figura 11</b> - Expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos de pacientes com LC após infecção com <i>L. braziliensis</i> .....	47
<b>Figura 12</b> - Expressão dos receptores <i>toll-like</i> 2 e 4 após infecção com <i>L. braziliensis</i> de monócitos de pacientes com LC e indivíduos saudios .....	48

<b>Figura 13</b> - Infecção com <i>L. braziliensis</i> nas subpopulações de monócitos ....	50
<b>Figura 14</b> - Expressão dos receptores <i>toll-like</i> 2 e 4 nas subpopulações de monócitos infectados com <i>L. braziliensis</i> .....	52
<b>Figura 15</b> - Expressão de TLR2 e TLR4 nos monócitos intermediários de pacientes com LC e indivíduos saudáveis, infectados com <i>L. braziliensis</i> .....	53
<b>Figura 16</b> - Representação gráfica da estratégia utilizada para identificar a expressão intracelular de TNF e IL-10 em monócitos expressando os receptores <i>toll-like</i> 2 e 4 .....	55
<b>Figura 17</b> - Expressão intracelular de TNF e IL-10 em monócitos infectados com <i>L. braziliensis</i> .....	57
<b>Figura 18</b> - Expressão intracelular de TNF e IL-10 em monócitos expressando ou não os TLRs 2 e 4, após infecção com <i>L. braziliensis</i> .....	59
<b>Figura 19</b> - Expressão intracelular de TNF e IL-10 nas subpopulações de monócitos expressando os TLRs 2 e 4, após infecção com <i>L. braziliensis</i> .....	61
<b>Figura 20</b> - Comparação entre a expressão intracelular de TNF e IL-10 nos monócitos expressando os TLRs 2 e 4 .....	62

#### IV. LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes com leishmaniose cutânea e controles sadios. .... 35

**Tabela 2:** Subpopulações de monócitos nos pacientes com leishmaniose cutânea..... 39

## V. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i> (Cluster de Diferenciação)
<b>CFSE</b>	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
<b>CMSP</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>CR</b>	Receptor do complemento
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LC</b>	Leishmaniose cutânea
<b>LCD</b>	Leishmaniose cutâneo-difusa
<b>LD</b>	Leishmaniose disseminada
<b>LM</b>	Leishmaniose mucosa
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LT</b>	Leishmaniose tegumentar
<b>LV</b>	Leishmaniose visceral
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> (proteínas quinases ativadas por mitógenos)
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NK</b>	Células <i>Natural Killer</i>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>Pam3Cys</b>	<i>Trihydrochloride Pam3Cys-Ser-(Lys)4</i> , agonista do TLR1/2

<b>PAMP</b>	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solução tampão de fosfato)
<b>PRRs</b>	Receptores de Reconhecimento de Padrões
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SC</b>	Subclínico
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>Th</b>	Linfócitos T <i>helper</i> (auxiliares)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator transformador de crescimento e transformação Beta
<b>TIR</b>	Receptor <i>Toll</i> / Interleucina-1
<b>TLR</b>	Receptor <i>Toll-Like</i> (similar a <i>Toll</i> )
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TRIF</b>	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i> (Adaptador indutor de IFN- $\beta$ contendo domínio TIR)

## VI. SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Aspectos Epidemiológicos .....	1
1.2.	Agente Etiológico e Transmissão .....	3
1.3.	Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar (LT) .....	4
1.4.	Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Tegumentar .....	5
1.5.	Macrófagos e Monócitos do Sangue Periférico Humano .....	7
1.6.	Receptores de Reconhecimento Padrão .....	12
1.7.	Receptores <i>Toll Like</i> (TLRs).....	14
1.8.	Receptores <i>Toll-Like</i> e <i>Leishmania</i> .....	18
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
4.1.	Geral .....	24
4.2.	Específicos .....	24
<b>5.</b>	<b>CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS. ....</b>	<b>25</b>
5.1.	Área de Estudo .....	25
5.2.	Definição dos Casos.....	26
5.3.	Desenho de Estudo .....	27
5.4.	Aspectos Éticos da Pesquisa .....	29
5.5.	Parasito .....	29
5.6.	Desenho Experimental .....	31

5.7.	Análise Estatística .....	34
6.	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
6.1.	Aspectos epidemiológicos e clínicos da população estudada. ....	35
6.2.	Análise da expressão <i>ex-vivo</i> dos TLR2 e TLR4 na população de monócitos .....	36
6.3.	Avaliação da expressão <i>in vitro</i> dos receptores TLR2 e TLR4 após infecção de monócitos humanos com <i>L. braziliensis</i> . ....	44
6.4.	Avaliação da expressão intracelular de TNF e IL-10 após infecção de monócitos que expressam os TLRs, com <i>L. braziliensis</i> . ....	54
7.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
8.	<b>SUMÁRIO DE RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
9.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>72</b>
10.	<b>FUTURAS DIREÇÕES</b> .....	<b>73</b>
11.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>74</b>
12.	<b>ANEXOS</b> .....	<b>88</b>

## **1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA**

### **1.1. Aspectos Epidemiológicos**

As leishmanioses representam um complexo de doenças infecciosas e não contagiosas, com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. São causadas por uma variedade de espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que se estabelecem em células fagocitárias mononucleares e determinam as formas clínicas tegumentares e viscerais da doença.

Hoje em dia, é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das mais importantes doenças infecciosas, não só pelo seu elevado risco de infecção e capacidade de produzir deformidades, como também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico. Embora estime-se que sejam causadoras da 9ª maior carga de doença entre as doenças infecciosas individuais, as leishmanioses são amplamente ignoradas nas discussões sobre as prioridades das doenças tropicais (Hotez et al., 2006; Hotez et al., 2004).

Endêmica em 98 países e 3 territórios, principalmente na Ásia, África e Américas do Sul e Central, a leishmaniose ampliou sua distribuição geográfica consideravelmente nos últimos anos, por causa da globalização econômica e do aumento do fluxo migratório de indivíduos não imunes para áreas endêmicas. São 1,6 milhões de novos casos por ano, sendo 1,2 milhão de leishmaniose cutânea e 400 mil de leishmaniose visceral (Alvar et al., 2012). Assumindo que praticamente todas as mortes são por leishmaniose visceral, cuja estimativa de letalidade é

superior a 10%, chega-se a um número preliminar de 40 mil mortes / ano devido à leishmaniose (Alvar et al., 2012).

No Brasil, tanto a forma visceral quanto a tegumentar são endêmicas e apresentam-se em galopante expansão geográfica. A forma visceral atinge 22 estados e tem uma prevalência de 3.000 novos casos ao ano, enquanto que a forma tegumentar é descrita em vários municípios de todo o país, sendo registrados em média cerca de 30.000 novos casos ao ano. A maior incidência da doença está nas regiões norte e nordeste (Ministério da Saúde, 2009).

No estado da Bahia, a incidência é elevada, 23,5/100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2011), sendo distribuída principalmente em áreas agrícolas. A vila de Corte de Pedra, localizada no município de Tancredo Neves a 280 km de Salvador, registra as maiores incidências de leishmaniose tegumentar no Estado, onde em 2010 foram notificados 1.556 novos casos da doença.

Nas últimas décadas, as análises epidemiológicas da leishmaniose têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença, inicialmente considerada zoonose de animais silvestres que ocasionalmente acometia pessoas em contato com as florestas. Há algum tempo, a doença começou a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas. Afeta indivíduos jovens, produtivos, e até mesmo crianças, que se expõem à infecção durante atividades agrícolas, podendo ser considerada uma doença ocupacional (FUNASA, 2000).

## 1.2. Agente Etiológico e Transmissão

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias vetores-dependentes, cujo agente etiológico é o protozoário do gênero *Leishmania* (Família Trypanosomatidae) (Grimaldi and Tesh, 1993), que causa um amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde uma lesão cutânea única até a forma visceral. Nas Américas, atualmente são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* causadoras de doença humana. No Brasil, as principais espécies são: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis* (Ministério da Saúde, 2009).

Os protozoários de são transmitidos para o homem através da picada de fêmeas hematófagas de insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, que são conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros.

Os parasitos de *Leishmania* apresentam duas formas evolutivas em seu ciclo de vida, a forma promastigota e amastigota. As fêmeas infectadas inoculam as formas promastigotas infectantes na pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Estes parasitos são englobados pelas células fagocíticas do hospedeiro (como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas), onde precisam sobreviver aos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro e se diferenciar em amastigotas no interior do fagolisossoma. Neste local as amastigotas se multiplicam até a ruptura da membrana celular do fagócito, quando são liberadas para infectar outros macrófagos, disseminando-se pelos tecidos e propagando a infecção (Hepburn, 2003; Lainson et al., 1987).

### 1.3. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar (LT)

A infecção por *Leishmania spp.* resulta em um amplo espectro clínico, que pode ser classificado em duas formas principais: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV). Dentre as manifestações da leishmaniose tegumentar observamos as formas cutânea (LC), mucosa (LM), disseminada (LD), cutânea difusa (LCD) e ainda a infecção subclínica (SC) ou assintomática. As formas clínicas da doença estão relacionadas com a espécie de *Leishmania* infectante, a região geográfica e a fatores da resposta imune do hospedeiro.

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, e é caracterizada pelo aparecimento de lesão ulcerada infiltrada na pele, com bordas elevadas, endurecida e eritematosa, que pode ou não sofrer cura espontânea (Marsden et al., 1984; Murray et al., 2005). Causada por diversos parasitos de *Leishmania*, como *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis* (Ministério da Saúde, 2009), pode se manifestar como uma lesão única, sendo chamada neste caso de leishmaniose cutânea localizada, ou por diversas lesões nodulares não ulceradas ricas em amastigotas e espalhadas por todo o corpo, sendo neste caso classificada como LCD (Carvalho et al., 1994).

Aproximadamente 3% dos indivíduos com LC desenvolvem a forma mais grave da doença, a leishmaniose mucosa, cujo principal agente causador é a *L. braziliensis*. Os pacientes sofrem com múltiplas ulcerações destrutivas nas mucosas da boca, laringe, nariz e faringe, que podem deixá-los permanentemente desfigurados e propensos a comprometimento respiratório, infecções bacterianas

secundárias e desnutrição (Jones et al., 1987; Marsden, 1986; Murray et al., 2005).

#### **1.4. Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Tegumentar**

A entrada de promastigotas na pele ocorre no momento da picada do flebótomo. Os neutrófilos estão entre as primeiras células a chegarem ao local e acredita-se que participam na contenção da *Leishmania* na primeira hora da infecção (Belkaid et al., 2000). Estudos demonstraram que no contexto da infecção iniciada pela picada do flebótomo infectado, os neutrófilos são recrutados para o local da picada e fagocitam os parasitas, num processo que é vital para a progressão da doença (Peters et al., 2008; van Zandbergen et al., 2004).

Os macrófagos atuam como as principais células hospedeiras para *Leishmania*. Uma vez aderidas à superfície dessas células, as promastigotas são fagocitadas, perdem o flagelo e transformam-se em amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo, onde se multiplicam por divisão binária. Os macrófagos desempenham um papel crucial no desenvolvimento da resposta imune contra esses parasitos, uma vez que participam da apresentação de antígenos, secreção de produtos microbianos e produção de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas). Por sua vez, o parasito tem alta atividade enzimática responsável por degradar os metabólitos oxidativos tóxicos produzidos pelos macrófagos, além de ser altamente adaptável ao pH ácido do fagolisossoma. Assim, as amastigotas podem sobreviver e se multiplicar no interior dos vacúolos fagocíticos. Estes eventos iniciais durante a interação das células do hospedeiro com o parasita podem determinar o curso da infecção (Bosque et al., 2000). A produção de IFN- $\gamma$  por células Th1 também é

importante para o controle da infecção, uma vez que essa citocina estimula a produção de óxido nítrico e superóxido pelos fagócitos (Bogdan et al., 2000; Liew and Cox, 1991; Murray et al., 1983).

Estudos experimentais em modelo murino de leishmaniose tegumentar mostram uma dicotomia clara entre a proteção mediada pelas células Th1 e a susceptibilidade à doença mediada pelas células Th2 com produção de IL-4 e IL-5 (Liew, 2002; Mosmann et al., 1986; Sacks and Noben-Trauth, 2002). Em humanos, a produção de IFN-  $\gamma$  na ausência da ativação das células Th1 é baixa ou ausente. Isto resulta na perda da capacidade de destruição dos parasitos de *Leishmania* pelos macrófagos, levando ao aparecimento das formas disseminadas da leishmaniose, como a leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea difusa (Bomfim et al., 1996; Carvalho et al., 1988).

Nas formas cutânea e mucosa da doença, os pacientes evoluem para a doença apesar de existir uma resposta imune protetora com eficaz eliminação dos parasitos. Do ponto de vista histopatológico, as lesões de pacientes com LC e LM são caracterizadas por um processo inflamatório com linfócitos e plasmócitos, e raros ou até mesmo com ausência de parasitos (Bittencourt and Barral, 1991; Mendes et al., 2013).

Atualmente, já está comprovado que a resposta imune participa da lesão tecidual na leishmaniose tegumentar. Ribeiro-de-Jesus et al. (1998) mostraram que pacientes com LC e LM produzem níveis elevados de IFN-  $\gamma$  e TNF, mas ao invés de controlar a infecção, desenvolvem úlceras cutâneas e mucosas. Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) destes mesmos pacientes, quando

estimuladas com antígeno solúvel de *L. braziliensis in vitro*, produzem muito pouco ou não produzem IL-10 e a adição exógena desta citocina não regula a produção de IFN- $\gamma$  e TNF nesses pacientes (Bacellar et al., 2002). Outros estudos mostraram ainda que a pentoxifilina, que é um inibidor de TNF, potencializa os efeitos benéficos do antimonial pentavalente (droga padrão utilizada no tratamento da leishmaniose) (Lessa et al., 2001; Machado et al., 2007).

Resultados recentes revelam a complexidade da regulação da produção de citocinas e dos mecanismos de aquisição de resistência ou susceptibilidade. É sabido que a produção de IFN- $\gamma$  por células Th1 favorece a ativação dos macrófagos e morte dos parasitos. No entanto, evidências mostram que a produção excessiva dessa citocina pode levar ao descontrole da reação inflamatória e consequente destruição dos tecidos. Estudos prévios do nosso grupo têm mostrado a importância da resposta inflamatória na destruição tecidual na leishmaniose tegumentar e a incapacidade de IL-10 modular esta resposta na leishmaniose mucosa. Pesquisas comprovam que existe uma associação entre a produção de IFN- $\gamma$  e TNF e o tamanho da lesão, assim como o aparecimento de formas mais graves da doença (Antonelli et al., 2005; Bacellar et al., 2002).

### **1.5. Macrófagos e Monócitos do Sangue Periférico Humano**

Os macrófagos teciduais desempenham papel crucial no combate aos parasitos de *Leishmania*, uma vez que atuam como células hospedeiras além de promover a eliminação dos parasitos. Tais células são oriundas da migração de

monócitos a partir da circulação e pela proliferação de precursores de macrófagos nos tecidos.

Monócitos são leucócitos circulantes provenientes da linhagem mieloide que medeiam essencialmente funções na imunidade inata incluindo fagocitose e produção de citocinas (Auffray et al., 2009). Estas células são formadas a partir de precursores da medula óssea e libertadas para o sangue periférico onde permanecem durante alguns dias. Após estímulos metabólicos, imunes e pró-inflamatórios, os monócitos migram para os tecidos periféricos, onde ocorre a diferenciação em macrófagos e células dendríticas, contribuindo para a defesa do hospedeiro e remodelação e reparação dos tecidos (Gordon and Taylor, 2005; Robbins and Swirski, 2010).

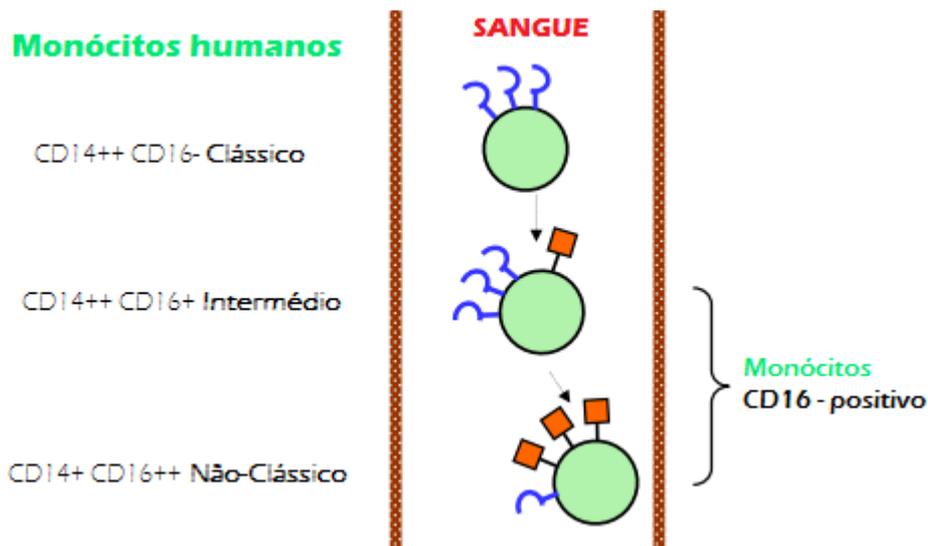
A morfologia dos monócitos na circulação periférica é heterogênea e essas células constituem aproximadamente 5-10% dos leucócitos presentes no sangue periférico no ser humano. Dentre as diversas funções que se encontram associadas a este tipo de células, salienta-se o papel dos monócitos como efetores inatos na resposta imune, mediando a defesa antimicrobiana do hospedeiro através da eliminação de agentes invasores por fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), mieloperoxidase e citocinas inflamatórias (Saha and Geissmann, 2011; Serbina et al., 2008). Nos próximos capítulos será descrito com mais detalhes os tipos descritos até hoje desta população de células fagocíticas, assim como os principais momentos de ação.

Ao longo das últimas duas décadas, muito do que se sabia sobre a heterogeneidade de monócitos humanos era baseada em dois subgrupos

subdivididos de acordo com a expressão de CD14 e CD16. Foi descrito que 90% dos monócitos clássicos do sangue expressavam a molécula CD14 em grande intensidade (CD14<sup>++</sup> ou CD14<sup>high</sup>) e não expressavam CD16 (CD16<sup>-</sup>). Além destes, cerca de 10% dos monócitos expressavam baixas quantidades de CD14 e apresentavam o CD16 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ou CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) (Fingerle et al., 1993; Ziegler-Heitbrock, 1996; Ziegler-Heitbrock et al., 1992). Vários estudos, além destes citados acima, foram realizados considerando apenas essas duas subpopulações, divididas também em monócitos CD16<sup>+</sup> ou CD16<sup>-</sup> (Belge et al., 2002; Gordon et al., 2005; Passlick et al., 1989; Ziegler-Heitbrock, 2007).

O elevado número de atividades e plasticidade dos monócitos levou a estudos sobre sua heterogeneidade populacional, que culminaram na divisão dos monócitos em subpopulações. Então, a partir de 2010, uma nova nomenclatura foi adotada pela comunidade internacional, onde foram definidas três subpopulações de monócitos no sangue periférico humano (Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

A divisão baseia-se na expressão e na intensidade da expressão de dois marcadores, o CD14 e o CD16. A subpopulação CD16<sup>+</sup> foi dividida em duas, compondo os monócitos intermediários e os não clássicos. Assim, em condições fisiológicas podem ser detectados: os monócitos clássicos, que expressam fortemente CD14 e não expressam o CD16 (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>), os intermediários, que expressam muito CD14 e CD16 (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>) e os não clássicos, que diminuem a expressão de CD14, mantendo uma elevada expressão de CD16 (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>++</sup>) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Estes monócitos estão representados na **Figura 1**.



**Figura 1 - Nomenclatura dos monócitos no sangue.** Os diferentes tipos de monócitos encontram-se representados com símbolos distintos que representam os marcadores cruciais das respetivas subpopulações de células. O gancho azul representa CD14 enquanto que o quadrado laranja representa CD16. O elevado número de um símbolo indica a elevada densidade desse mesmo receptor e as setas representam a relação de desenvolvimento. Isto não significa que o desenvolvimento realmente ocorre nos compartimentos do sangue. Imagem adaptada de (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010).

Cerca de 90% dos monócitos são clássicos e os 10% restantes são subdivididos em intermediários e não clássicos, sendo os intermediários encontrados em menor percentagem (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010).

As análises genômicas confirmaram a existência das três subpopulações dos monócitos no sangue humano (Cros *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011; Zawada *et al.*, 2011) e têm auxiliado na demonstração das evidências de que as subpopulações são estágios diferenciais de desenvolvimento dos monócitos. Estes trabalhos mostram claras diferenças entre as subpopulações, porém, enquanto Cros *et al.* (2010) mostraram que as subpopulações de monócitos clássicos e intermediários estão mais próximas, Wong *et al.* (2011) e Zawada *et al.* (2011) demonstraram uma maior proximidade entre os monócitos intermediários e não clássicos. Estes dois últimos trabalhos mostram que os genes mais expressos pelos monócitos

intermediários estão em níveis transicionais entre os monócitos clássicos e não clássicos. Outros estudos também evidenciam as características transicionais dos monócitos intermediários em relação às outras subpopulações (Ancuta et al., 2009; Ziegler-Heitbrock, 1996; Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

As subpopulações de monócitos expressam alguns genes que lhes conferem diferenças fenotípicas e funcionais. Algumas características são específicas a cada subpopulação, outras são compartilhadas em menor ou maior grau. Há diferenças, por exemplo, quanto à expressão de receptores para antígenos, de moléculas de adesão, de receptores acoplados a proteína G e produção de quimiocinas e citocinas. Estas células podem responder diferencialmente a produtos bacterianos e virais, via diferentes receptores similares a Toll (TLRs), para a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (Cros et al., 2010; Wong et al., 2011; Zawada et al., 2011).

Embora não haja um consenso em relação à produção de citocinas pelas diferentes subpopulações de monócitos (Belge et al., 2002; Cros et al., 2010; Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008; Smedman et al., 2011; Wong et al., 2011), parece que os monócitos não clássicos são os maiores produtores de TNF, enquanto os clássicos seriam os que produzem maiores quantidades de IL-10, após estimulação com LPS (Belge et al., 2002; Wong et al., 2011).

Em algumas infecções foram demonstradas alterações das frequências das diferentes subpopulações associadas com formas mais brandas ou mais graves de doenças. Foi demonstrado que a subpopulação CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> (monócitos intermediários) é a principal subpopulação de monócitos associada ao aumento da gravidade da infecção por HIV (Han et al., 2009). Também foi demonstrado um

aumento dos monócitos intermediários na forma leve de dengue (Azeredo et al., 2010). Em todos os trabalhos, a expansão durante as infecções, bacterianas ou virais, é dos monócitos intermediários ou não clássicos, ou seja, os que expressam CD16 (Wong et al., 2012).

Em todas as doenças citadas acima, a expansão das subpopulações de monócitos CD14<sup>+</sup> expressando CD16 parece estar associada ao processo inflamatório e à gravidade da doença. Na LT, na forma cutânea, os pacientes apresentam elevado número de monócitos CD16<sup>+</sup> e maior intensidade de expressão do CD16 nestes monócitos, quando comparados com controles sadios (Soares et al., 2006). Neste contexto, mais estudos são necessários para avaliar a participação das diferentes subpopulações de monócitos na LT.

## **1.6. Receptores de Reconhecimento Padrão**

O sistema imune inato é importante no reconhecimento de micro-organismos e na ativação de uma resposta imune efetiva que depende da presença de uma variedade de receptores presentes na superfície da membrana das células humanas que reconheçam os patógenos como estranhos. Estes receptores são chamados de receptores de reconhecimento padrão (PRRs, *pattern-recognition receptors*) (Gordon, 2002; Medzhitov, 2007).

Os PRRs reconhecem um grupo moléculas estáveis (que não sofrem mutações), presentes em todos os agentes infecciosos, chamado padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) (Ozinsky et al., 2000). São exemplos de PAMPs os lipopolissacarídeos

(LPS, *lipopolysaccharide*) presentes em bactérias gram-negativas, peptidoglicanos (PGN, *peptidoglycan*) presentes na parede celular de bactérias gram-positivas, ácido lipoteicóico (LTA, *lipoteichoic acids*) presente em diversos fungos, e outros componentes das paredes celulares microbianas (Gazzinelli *and* Denkers, 2006; Poltorak et al., 1998; Takeuchi et al., 1999). Certos fragmentos de ácidos nucleicos constituídos por repetições de citosina e guanina também podem ser reconhecidos como PAMPs (Shah et al., 2003). A ativação do sistema imune inato através dos PRRs fornece os sinais necessários para a iniciação e ativação da resposta imune adaptativa. Parte dos PRRs é responsável pela fagocitose, e outra parte ativa uma cascata de reações intracelulares que promoverão a síntese de citocinas.

A entrada do parasito *Leishmania* é regulada pelo reconhecimento de vários receptores na superfície dos fagócitos, como receptor de manose-fucose (*mannose-fucose receptor, MFR*), receptor de fibronectina, receptor para produtos finais de glicosilação avançada (*receptor for advanced glycosylation end, AGE*), receptor Fc (*FcR*) e receptores do complemento, CR1 e CR3 (Guy *and* Belosevic, 1993). As várias moléculas relacionadas com o parasito, que são detectadas pelos PRRs sugerem a importância das moléculas de sinalização relacionadas com estes receptores na resistência a infecções parasitárias.

Entre os principais receptores de reconhecimento padrão que podem desencadear a produção de citocinas estão os TLRs, que são utilizados por diversos tipos celulares no reconhecimento, internalização e processamento de antígenos, atuando como molécula central na ligação entre as respostas imunes inata e adaptativa (Akira *and* Hemmi, 2003; Medzhitov *and* Janeway, 2000).

## 1.7. Receptores *Toll Like* (TLRs)

Os TLRs foram descobertos durante estudos com *Drosophila* que mostraram a eficiente resposta imune deste inseto (Hashimoto et al., 1988). Durante estes estudos, foi descoberto um receptor que reconhecia fragmentos de bactérias, fungos ou vírus e iniciavam a resposta imune do inseto.

Medzhitov et al. (1997) relataram a caracterização de proteínas humanas (análogas à proteína *toll* das drosófilas) presentes nas células do sistema imune inato que, ao serem ativadas por PAMPs, provocavam a ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B e a transcrição de diferentes citocinas pró-inflamatórias. Foram chamadas então de receptores *toll-like*.

TLRs são glicoproteínas transmembrana do tipo 1, contendo um domínio extracelular com repetições consecutivas ricas em leucinas (LRR) que estão envolvidas no reconhecimento do ligante (Bell et al., 2003; Matsushima et al., 2007). O domínio intracelular contém uma região altamente conservada - domínio associado a receptor *Toll* / Interleucina-1 (TIR) - que facilita as interações entre TLRs e moléculas sinalizadoras (Medzhitov and Janeway, 1997). O mecanismo pelo qual o domínio extracelular dos receptores *toll-like* reconhece o próprio do não próprio ainda não está esclarecido. Além disso, cada TLR pode reconhecer diversos ligantes sem qualquer similaridade estrutural, dificultando a compreensão da interação deste receptor com as PAMPs.

Os receptores *toll-like* estão presentes em vários tipos celulares, incluindo linfócitos T e B, células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, células neoplásicas, além de células da imunidade inata como neutrófilos, monócitos/macrófagos, células

dendríticas, células NK e mastócitos, ativando mecanismos da resposta imediata contra patógenos (Chang, 2010; Takeda et al., 2003).

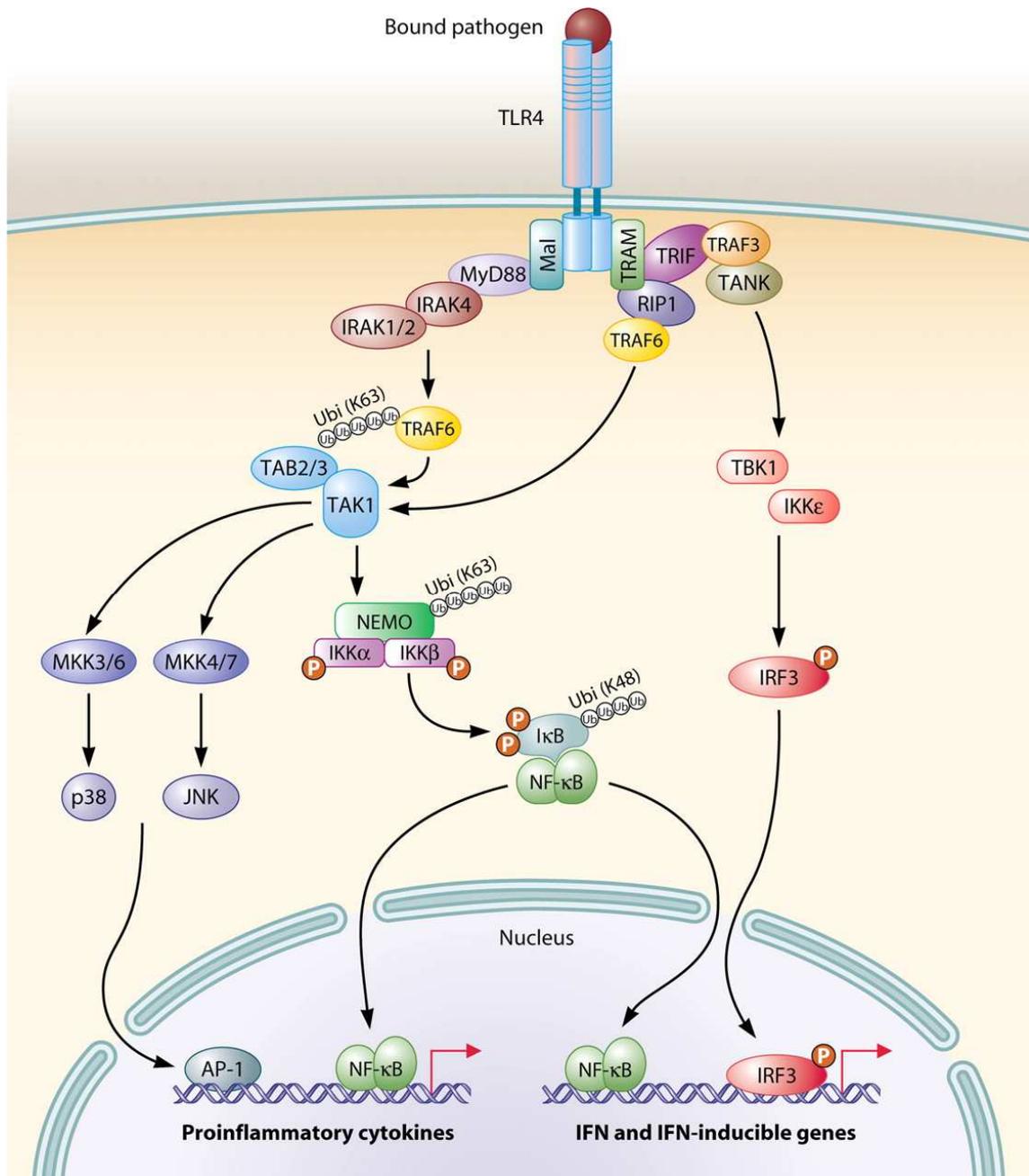
Atualmente já foram descritos 10 TLRs em humanos (TLR1-10) e 12 em camundongos (TLR1-9 e TLR11-13) (McGettrick *and* O'Neill, 2010). De acordo com a localização celular, na membrana plasmática ou em endossomos intracelulares, os TLRs podem ser divididos em dois grandes grupos. Os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 estão presentes na superfície celular e reconhecem estruturas lipídicas, exceto o TLR5 que reconhece a proteína flagelina, característica dos flagelos de alguns micro-organismos. O grupo formado pelos TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 tem localização intracelular e reconhece sequências de oligonucleotídeos.

O TLR1 e o TLR6 não atuam isoladamente. O reconhecimento de PAMPs por eles ocorre através da heterodimerização com TLR2, que vai acionar os sinais responsáveis pela ativação da resposta imune inata e adaptativa. Porém, a ligação destes TLRs não significa que eles atuem totalmente com a mesma resposta do TLR2.

Os PAMPs reconhecidos por alguns TLRs já foram identificados. Por exemplo, TLR2 reconhece peptidoglicanos e lipoproteínas bacterianas de bactérias gram-positivas e micobactérias (Aliprantis et al., 1999; Brightbill et al., 1999; Gazzinelli *and* Denkers, 2006), e também é ativado por âncoras de glicosilfosfatidilinositol de *T. cruzi* (Campos et al., 2001). Lipopolissacarídeos (LPS) de enterobactérias são ligantes para TLR4, e a ativação deste receptor é essencial para a resposta a bactérias gram-negativas.

O reconhecimento de diferentes PAMPs por cada receptor *Toll* desencadeia a ativação de cascatas de sinalização, levando à indução de genes envolvidos na defesa do hospedeiro (**Figura 2**). Após esta ligação, os TLRs se dimerizam e sofrem alterações conformacionais necessárias para o recrutamento de moléculas adaptadoras contendo o domínio TIR, tais como MyD88 e TRIF, com o domínio TIR do TLR (Akira et al., 2006). MyD88 é uma molécula adaptadora utilizada pela maioria dos TLRs, com exceção do TLR3, que utiliza a TRIF para ativar as vias do fator de transcrição nuclear NFkB e do fator do tipo 3 regulador de interferon (IRF3) (Akira et al., 2006; Kawai et al., 1999; Kawai *and* Akira, 2007; Saitoh *and* Miyake, 2009).

As respostas diferenciais mediadas por distintos ligantes de TLR podem ser explicadas, em parte, pela utilização seletiva destas moléculas adaptadoras. MyD88 e TRIF são responsáveis pela ativação de vias de sinalização distintas, conduzindo à produção de citocinas pró-inflamatórias e IFNs do tipo I, respectivamente (Akira et al., 2006; Singh et al., 2012).



**Figura 2 - Princípios da sinalização dos TLRs.** TLR4 ativa ambos os caminhos, as vias dependente e independente de MyD88. A via dependente de MyD88 é responsável pelo início da fase de NF-κB e ativação de MAPK, que controlam a indução de citocinas pró-inflamatórias. A via independente de MyD88, é dependente de TRIF e ativa IRF3, que é necessária para a indução de genes que induzem IFN e β-IFN. Além disso, esta via medeia a fase tardia do NF-κB, assim como a ativação de MAPK, contribuindo também para as respostas inflamatórias. Imagem adaptada de Mogensen T H Clin. Microbiol. Rev. 2009;22:240-273.

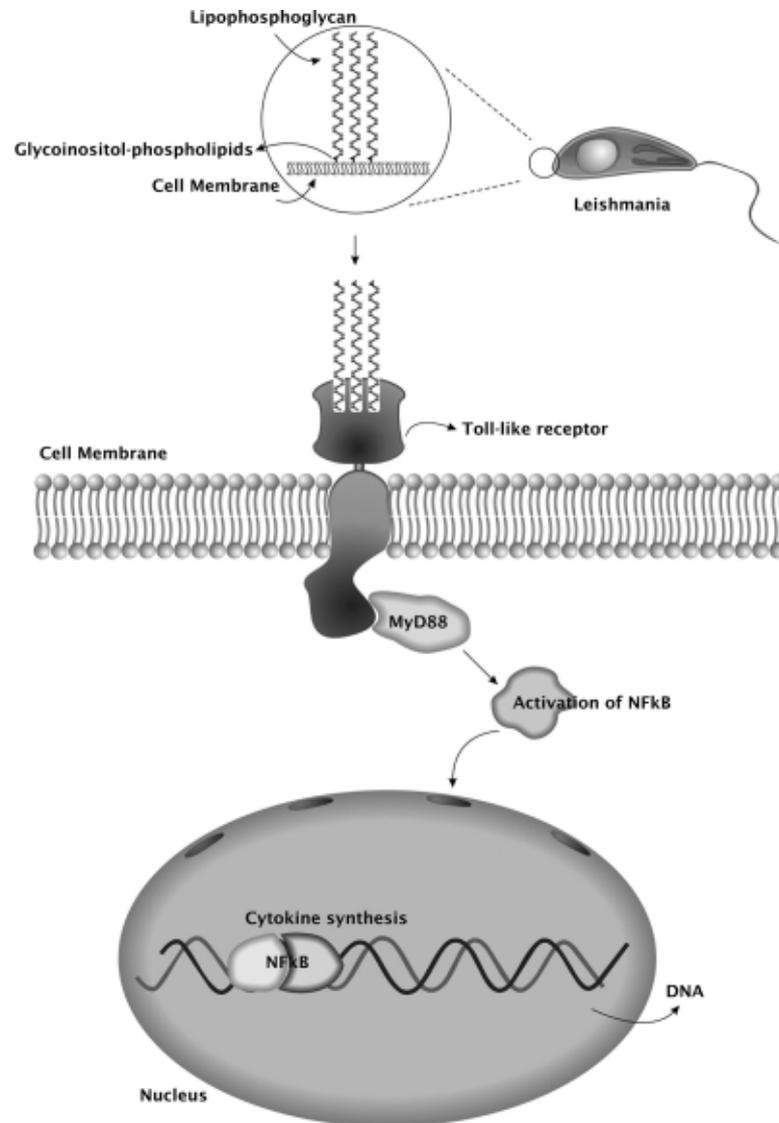
## 1.8. Receptores *Toll-Like* e *Leishmania*

A capacidade das espécies de *Leishmania*, de invadir e sobreviver dentro das células do hospedeiro, envolve a interação de moléculas presentes na superfície do parasito com receptores nos macrófagos (Guerra et al., 2010). Vários estudos têm demonstrado que receptores diferentes medeiam a captação e fagocitose de *Leishmania sp.* por macrófagos, embora os acontecimentos iniciais de sinalização sejam desconhecidos.

Uma vez que pesquisas recentes sugeriram o papel dos TLRs no reconhecimento de *Plasmodium*, *Toxoplasma* e *Trypanosoma* (Gazzinelli et al., 2004), vários grupos ao redor do mundo também iniciaram investigação para o papel de TLRs na leishmaniose (Adachi et al., 2001; Campos et al., 2001; Kedzierski et al., 2004; Scanga et al., 2002; Yarovinsky and Sher, 2006). Todos os TLRs são expressos nos macrófagos quando ativados por IFN- $\gamma$  (Flandin et al., 2006), sendo os macrófagos as células mais estudadas na interação *Leishmania*-TLR. Porém, nem todos os TLRs reconhecem os antígenos de *Leishmania*. Diversos trabalhos demonstraram que os macrófagos reconhecem a *Leishmania* através de TLR2, TLR4 e TLR9 (Becker et al., 2003; de Veer et al., 2003; Flandin et al., 2006; Kropf et al., 2004a; Kropf et al., 2004b).

Estudos recentes sugeriram que os TLRs também estão envolvidos em outras funções dos macrófagos, como fagocitose, maturação e atividade microbicida nos fagossomos (Flandin et al., 2006). TLRs estão envolvidos, por exemplo, na ativação das respostas Th1 e Th2, na secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos humanos e

murinos infectados por *Leishmania panamensis*, e que participam no controle inicial da infecção (Gallego et al., 2011).



**Figura 3 – Via de ativação do TLR e MyD88 na infecção por *Leishmania***, sugerindo antígenos específicos do patógeno como ativadores da cascata de reações que culmina com a ativação do NF-κB e síntese de citocinas. Adaptado de Infect Immun. 2008 March; 76(3): 866–872.

O TLR2 é acionado por glicolípidios presentes na membrana de *Leishmania* sp, estimulando macrófagos a secretarem citocinas como IL-12 e TNF (de Veer et al., 2003) (**Figura 3**). Durante a infecção por *Leishmania donovani*, o parasito

modula a ativação de p38 MAPK mediada pelo TLR2, suprimindo a produção de IL-12 e aumentando a produção de IL-10. Isto sugere que a *Leishmania* possui mecanismos moduladores das respostas inflamatórias induzidas via TLRs (Chandra and Naik, 2008). Evidências mostram também que a deficiência de TLR2 é responsável pela redução na carga parasitária e no recrutamento de células inflamatórias (Guerra et al., 2010).

Os resultados encontrados nos estudos envolvendo o TLR4 foram bastante controversos. Algumas pesquisas indicam que o TLR4 contribui mais significativamente com o controle do crescimento de *Leishmania spp.* Kropf et al. (2004b) demonstraram que camundongos deficientes em TLR4 são mais susceptíveis à infecção com *L. major*, apresentando lesões e carga parasitária maiores do que camundongos TLR4-competentes. Porém, outro estudo mostrou que a inibição do TLR4 não aumentava o número de lesões (Antoniazzi et al., 2004).

Através dos TLRs, os adjuvantes parecem melhorar a eficácia das vacinas e da imunoterapia, abordagens promissoras na terapêutica para o tratamento da leishmaniose. Estudos mostraram que o Ara-LAM (*Arabinosylated lipoarabinomannan*), novo ligante TLR-*Leishmania*, ativa TLR2 suscitando a produção de citocinas pró-inflamatórias e proteção contra LV (Bhattacharya et al., 2010). A vacinação subcutânea com adjuvantes agonistas dos TLR 7 e TLR8 gera uma forte resposta Th1e suprime a resposta Th2 (Zhang and Matlashewski, 2008). A ativação de TLR4 durante a imunoterapia da leishmaniose tem sido associada com um aumento na taxa de cura em modelos animais (Baldrige et al., 2004; Calvopina et al., 2006; Raman et al., 2010; Reed et al., 2009), mostrando a relação entre o TLR e imunoterapia para a infecção por *Leishmania*.

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos vários estudos sobre a imunologia da LTA, os mecanismos que levam ao controle ou à persistência dos parasitos ainda são obscuros, especialmente com relação à infecção causada por *L. braziliensis*, que pode culminar na cura clínica das lesões ou no desenvolvimento de lesões inflamatórias crônicas destrutivas.

Estudos avaliando a resposta imune contra *Leishmania* têm mostrado uma relação entre a resposta exacerbada com a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias e o desenvolvimento de lesão tecidual. O uso de drogas moduladoras da resposta imune também confirmam as evidências de que a resposta imune exagerada e não modulada está associada a patogênese da doença.

Uma vez que alguns autores sugerem que a resposta imune inata determina o padrão de resposta imune (Hondowicz *and* Scott, 1999; Scharon-Kersten *and* Scott, 1995), foram realizados alguns estudos em modelos experimentais de leishmaniose para determinar a função dos TLRs na indução e padrão da resposta imune.

Macrófagos são as principais células no combate aos parasitos de *Leishmania*, uma vez que atuam tanto como célula hospedeira quanto no combate à infecção. Várias pesquisas têm mostrado o reconhecimento de moléculas derivadas de *Leishmania* por macrófagos através de diferentes TLRs (Becker et al., 2003; de Veer et al., 2003; Flandin et al., 2006; Kropf et al., 2004a). Macrófagos teciduais são oriundos da migração de monócitos do sangue periférico após estímulos metabólicos, inflamatórios e imunes. Em várias doenças inflamatórias, infecção bacteriana e viral já foi evidenciado que uma alteração entre as subpopulações de

monócitos pode estar associada ao processo inflamatório e gravidade da doença. Portanto, um desequilíbrio entre as subpopulações de monócitos poderia estar envolvido na imunopatogenia da LT, ou mesmo ser a causa ou ainda consequência do ambiente inflamatório gerado durante a infecção.

Ainda, estudos experimentais têm revelado a importância dos receptores *toll-like* como adjuvantes em vacinas e na imunoterapia contra leishmaniose (Calvopina et al., 2006; Raman et al., 2010; Reed et al., 2009).

Entretanto, todos os estudos experimentais *in vitro* ou *in vivo* de TLRs utilizaram espécies de *Leishmania* não encontrados no Brasil. Praticamente nenhum destes modelos avaliou a infecção por *L. braziliensis*, o principal agente etiológico da leishmaniose cutânea no Brasil. Da mesma forma, temos pouquíssimos estudos na literatura que abordem a expressão dos TLRs na leishmaniose em humanos.

E finalmente, o conhecimento da resposta imune inata será útil para o desenvolvimento de novas práticas terapêuticas, diagnósticas e preventivas.

### **3. HIPÓTESE**

A expressão dos receptores *Toll-Like 2* e *Toll-Like 4* em monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea está associada ao perfil de células inflamatórias que chegam ao local da infecção, à forte resposta inflamatória e ao desenvolvimento da lesão observados nessa doença.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Geral

Caracterizar a expressão dos receptores *Toll Like 2* e *Toll Like 4* em monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea.

### 4.2. Específicos

1. Avaliar a expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos de pacientes com Leishmaniose cutânea (LC) e Controles Sadios (CS), *ex-vivo* e após infecção com *L. braziliensis*;
2. Avaliar a expressão de TLR2 e TLR4 nas subpopulações de monócitos de pacientes com LC e CS, *ex-vivo* e após infecção com parasitos de *L. braziliensis*;
3. Avaliar a expressão intracelular de TNF e IL-10 em monócitos de pacientes com LC que expressam TLR2 ou TLR4 após infecção com *L. braziliensis*.

## 5. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.

### 5.1. Área de Estudo

O Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Professor Edgar Santos (ComHUPES) desenvolve trabalhos de pesquisa clínica e imunológica, além de realizar assistência médica a pacientes com leishmaniose tegumentar há mais de 25 anos na área endêmica de Corte de Pedra. Em 1986 foi construído um posto de saúde na região que se tornou referência para diagnóstico e tratamento da Leishmaniose.

Corte de pedra é um vilarejo rural que pertence ao município de Tancredo Neves, no Sudoeste da Bahia. Está localizado a cerca de 30 km da região de Três Braços e 280 km de Salvador. No entanto, a área endêmica de Corte de Pedra vai muito além, englobando cerca de 20 municípios que estão contidos dentro de uma área de, aproximadamente, 10.000 km<sup>2</sup>. A área anteriormente era dominada pela Mata Atlântica, que com o passar do tempo foi reduzida a pontos isolados de mata secundária, e hoje é formada em quase toda a sua extensão por áreas agrícolas desmatadas.

A principal fonte de renda para a maioria dos habitantes da região é a agricultura de subsistência, destacando-se principalmente a cultura cacaeira e lavouras como cravo, guaraná, banana, café, mandioca, pimenta-do-reino e seringueira. Este contexto tornou a população altamente exposta à infecção por *L. braziliensis*, transmitidos principalmente por *Lutzomia whitmany* e *Lutzomyia intermedia*, insetos flebotomíneos endêmicos na fauna local (Grimaldi et al., 1989;

Miranda et al., 2002). Esta é a região onde são registradas as taxas de incidência da doença mais elevadas no estado.

Quinzenalmente, médicos vinculados ao Serviço de Imunologia do HUPES, incluindo clínicos, imunologistas, infectologistas, dermatologistas e otorrinolaringologistas, visitam o posto de saúde de Corte de Pedra promovendo atendimento médico para a população da região. O posto também conta com o apoio de 4 agentes de saúde treinados, residentes no vilarejo, que prestam assistência aos pacientes, visitam as famílias e participam das atividades de pesquisa.

## **5.2. Definição dos Casos**

### **5.2.1. Leishmaniose Cutânea (LC)**

É definida como a presença de lesão ulcerada na pele, sem evidência de envolvimento da mucosa. O diagnóstico é realizado pela detecção do parasito através da cultura do aspirado da lesão, ou pelo achado da lesão típica associado ao teste positivo de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* (Reação de Montenegro) e histopatologia compatível com leishmaniose tegumentar. Atualmente, o diagnóstico tem sido realizado através da Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa (qPCR) de biópsias das amostras de lesões.

### **5.2.2. Controles Sadios (CS)**

Indivíduos adultos não residentes na área endêmica, sem história de LC ou LM, que aceitaram participar do estudo.

### **5.3. Desenho de Estudo**

Este foi um estudo de corte transversal em pacientes com leishmaniose cutânea. Foi avaliado um total de 37 pacientes com LC e 22 indivíduos sadios, através de experimentos distintos. Os indivíduos utilizados como controles sadios foram, na sua maioria, estudantes da área urbana de Salvador e que não tiveram história de contato com a área endêmica de leishmaniose.

As análises imunológicas foram realizadas antes do tratamento para todos os pacientes que participaram do estudo. Os experimentos não incluíram necessariamente amostras de todos os pacientes. A distribuição da quantidade de pacientes em cada experimento segue ilustrada abaixo na **figura 4**.

### 5.3.1. Fluxograma Ilustrativo do Estudo

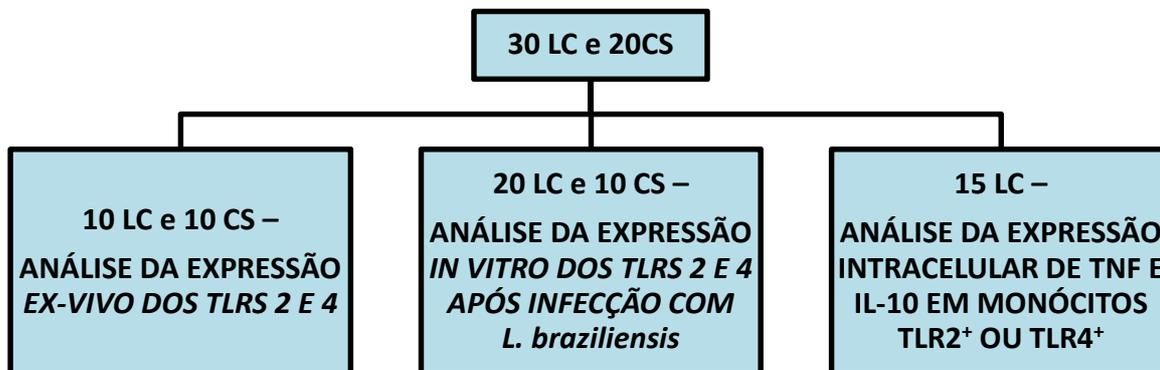


Figura 4 - Fluxograma ilustrativo do estudo.

### 5.3.2. Critérios de Inclusão

Pacientes com LC foram selecionados de acordo com os critérios e definição de casos descritos acima. Foram incluídos pacientes com duração da doença não superior a 60 dias, virgens de tratamento para leishmaniose e com no máximo três lesões cutâneas.

### 5.3.3. Critérios de Não Inclusão

Pacientes com sorologia positiva para HIV e portadores de doenças debilitantes como insuficiência renal, insuficiência hepática e diabetes mellitus; indivíduos que tenham feito uso de drogas imunossupressoras ou apresentando condições que pudessem alterar a resposta imune ou ainda que contra indicassem a

doação de sangue para a avaliação sorológica como, por exemplo, menores com idade inferior a 15 anos e gestantes.

#### **5.4. Aspectos Éticos da Pesquisa**

Este trabalho faz parte de um projeto aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia (Parecer/Resolução nº019/2008).

Todos os participantes foram voluntários que consentiram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO), que explica nossa proposta e procedimento. O mesmo foi lido pelo participante ou por um dos médicos da equipe na presença de uma testemunha.

Todos os pacientes diagnosticados com leishmaniose tegumentar foram tratados com antimonial pentavalente, independente de participarem do estudo. Este é o tratamento padrão recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pelo Ministério da Saúde.

#### **5.5. Parasito**

Foram utilizados parasitos de *L. braziliensis* (MHOM/BR/LTCP11245) caracterizados quanto à espécie pelo método de eletroforese de enzima *multicolus* (Cupolillo et al., 1994). Este isolado foi obtido a partir de uma lesão da pele de um paciente com LC, proveniente da região de Corte de Pedra, sendo inicialmente

cultivado em meio bifásico (NNN). Após o isolamento, o parasito foi criopreservado em nitrogênio líquido no Serviço de Imunologia do HUPES.

Para infecção in vitro das CMSP foram utilizadas promastigotas de *L. braziliensis* na fase estacionária de crescimento, cultivadas em meio *Schneider* (sigma Aldrich, St. Louis, MO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gilco BRL), com 2% de urina estéril.

Em alguns experimentos, os parasitos foram corados com o marcador de ativação celular CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) a 5mM, da seguinte forma: Após duas lavagens com salina 0,9% a 37°C, uma alíquota de  $60 \cdot 10^6$  promastigotas foi colocada em 5ml de salina 0,9% (1). Em seguida, foi adicionado 2,5µl de solução de CFSE (10µl de CFSE + 240µl de salina 0,9%) em tubo contendo 5ml de salina 0,9% (2). A solução contendo os parasitos foi adicionada à solução diluída de CFSE (1+2) e incubada por cinco minutos a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, sob agitação, na ausência de luz. Após este período, foram realizadas mais duas lavagens com solução de salina 0,9% contendo 20% SFB, para eliminar aqueles parasitos que não foram corados.

Os parasitos corados com CFSE foram conservados em 6ml de meio RPMI 1640 completo.

## **5.6. Desenho Experimental**

### **5.6.1. Isolamento de Monócitos do Sangue Periférico**

Células Mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas a partir de sangue heparinizado dos pacientes e doadores saudáveis, diluído 1:2 com salina 0,9% a temperatura ambiente, através do gradiente de densidade *Ficoll Hypaque* (LSM; Organon, Durham, NC).

O anel de células mononucleares foi então lavado duas vezes com salina 0,9% a 1290 rpm por 10 minutos. As células mononucleares foram colocadas em meio RPMI 1640 completo (soro AB humano a 10% inativado, 100 U de penicilina/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml) e ajustadas na concentração  $1 \times 10^6$  células/ml.

### **5.6.2. Infecção dos Monócitos com cepa de *L. braziliensis***

As CMSP ( $1 \times 10^6$  cels/tubo) de pacientes com LC e dos indivíduos saudáveis, foram infectadas com parasitos de *L. braziliensis* marcados com CFSE (como descrito anteriormente), na proporção de 5:1 parasitos por célula, e incubadas durante uma hora, a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>.

Após este período, os parasitos extracelulares foram lavados com solução de salina 0,9% contendo 10% de SFB. Em seguida, as células foram colocadas em meio RPMI 1640 completo e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, por 4

horas. A infecção foi avaliada através da fluorescência do CFSE (FITC), por citometria de fluxo.

### **5.6.3. Análise da expressão de CD14, CD16, TLR2 e TLR4 em monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo**

A expressão de CD14, CD16, TLR2 e TLR4 em monócitos derivados do sangue periférico de pacientes cm LC e indivíduos sadios, foi analisada tanto *ex-vivo* quanto *in vitro*, após infecção com parasitos de *L. braziliensis* marcadas com CFSE por 1 hora ou incubação com lipopolissacarídeo (LPS) (100ng/ml), lipopeptídeo sintético *Trihydrochloride Pam3Cys-Ser-(Lys)4* (Pam3Cys) (100ng/ml), a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, por 4 horas, através de citometria de fluxo.

A expressão das moléculas de superfície foi analisada através da marcação com os seguintes mAbs:

- anti-CD14 conjugado com Percp-Cy 5.5 (clone 61D3) e anti-CD16 conjugado com APC (clone CB16) (eBioscience, San Diego, CA, EUA);
- anti-TLR2 conjugado com PE (clone TL2.1) e anti-TLR4 conjugado com PE (clone HTA125) (IMGENEX, San Diego, CA, EUA).

A análise da expressão dos TLR2 e TLR4 foi feita em tubos separados. Após este período, as células foram lavadas e ressuspensas em solução de paraformaldeído 4%. Foram adquiridos pelo menos 200.000 eventos no citômetro de fluxo BD FACS CANTOII. A análise dos dados foi realizada pelo programa *FlowJo* (Free Star Inc.).

Também foi realizada a análise de amostra controle não marcada (sem adição de anticorpo com fluorescência) e dos controles isotípicos FITC, PE, APC e Percp-Cy 5.5.

#### **5.6.4. Análise da Expressão de TNF- $\alpha$ e IL-10 nos Monócitos através de Citometria de Fluxo**

CMSP infectadas com parasitos de *L. braziliensis* (não marcados com CFSE) ou na ausência de qualquer estímulo, foram incubadas por 8 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. *Stop Golgi* (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) foi adicionado no início da cultura de 8 horas, para análise das citocinas intracelulares.

Em seguida, as células foram marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD14 (Percp-Cy 5.5), anti-CD16 (APC) e anti-TLR2 (PE) ou anti-TLR4 (PE) e seus respectivos isotipos, durante 15 minutos a 4°C na ausência de luz. As células foram lavadas com PBS (1500 rpm, 5 min, 4°C), fixadas com solução de paraformaldeído 4%. Posteriormente, as células foram permeabilizadas com solução de *Perm Wash* por 15 minutos a 4°C, sem luz.

A marcação intracelular foi realizada com os anticorpos anti-TNF (FITC) ou anti-IL-10 (FITC) por 30 minutos. Após este período as células foram lavadas e ressuspensas em 400 $\mu$ l de PBS para análise por citometria de fluxo no BD FACS CANTO II. Foi adquirido um total de 200.000 eventos. A análise dos dados foi realizada pelo programa FlowJo® Free Star Inc. A amostra controle não marcada e os controles isotípicos com FITC, PE, Percp-Cy5.5 e APC foram adicionados ao experimento.

## 5.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente usando o programa *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA*).

A comparação entre grupos (pacientes com LC e indivíduos sadios) foi realizada através do teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Um erro  $\alpha$  abaixo de 5% ( $p < 0,05$ ) foi considerado para significância estatística.

O teste paramétrico da análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas foi calculada para avaliar as diferenças entre três ou mais grupos, com o pós-teste de *Bonferroni's* quando o valor de  $p$  foi  $<0,05$ .

As diferenças na expressão entre apenas 2 grupos foram avaliadas através do Teste *t* de Student, de acordo com a distribuição normal destas variáveis.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos da população estudada.

Foram analisados pacientes com leishmaniose cutânea, residentes na região endêmica de Corte de Pedra, e indivíduos saudáveis, não residentes em área endêmica. Os dados epidemiológicos e clínicos da população estudada estão resumidos na **Tabela 1**.

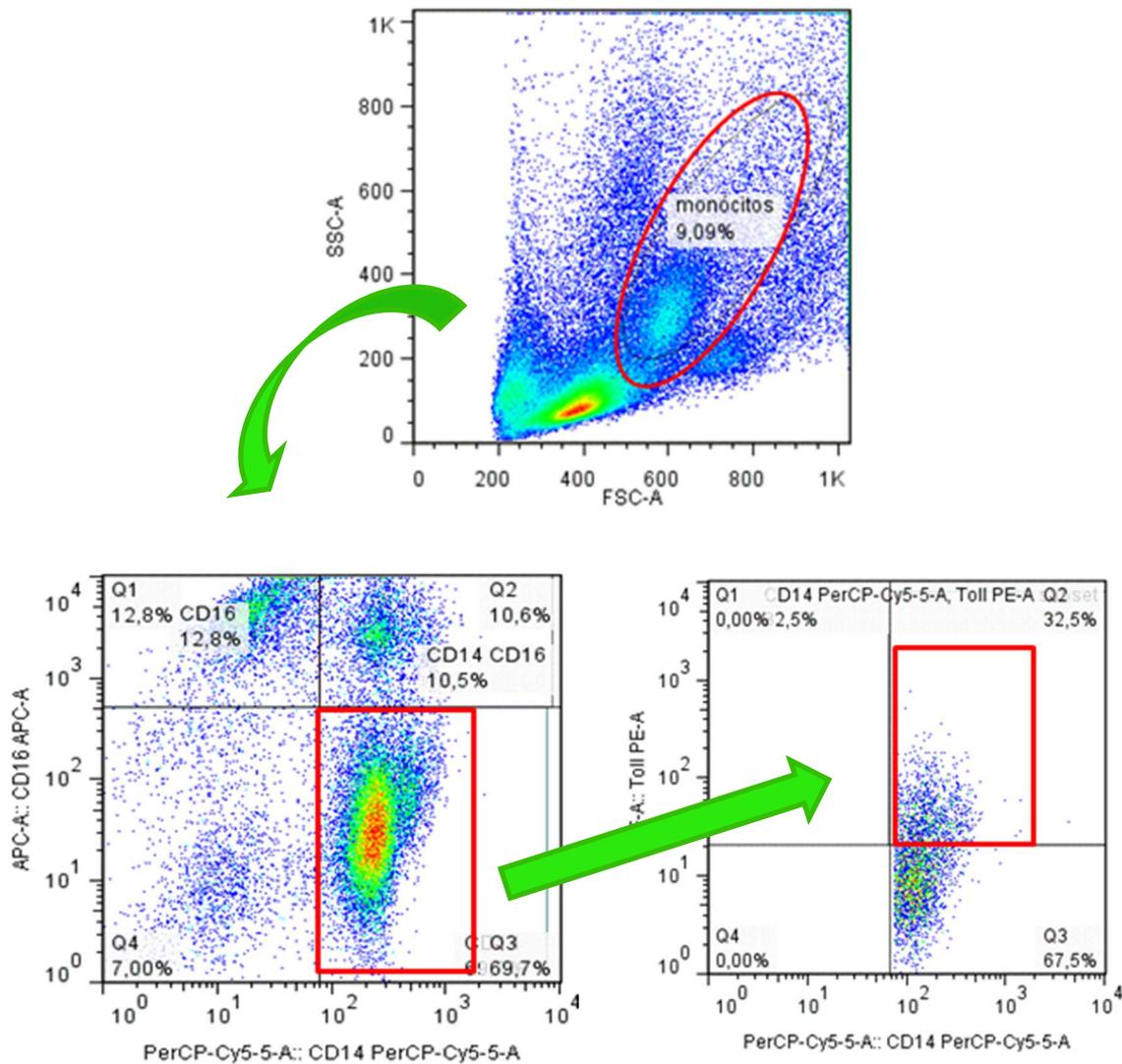
**Tabela 1: Aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes com leishmaniose cutânea e controles saudáveis.**

	<i><b>Pacientes</b></i>	<i><b>Controles</b></i>
<i>Número</i>	30	20
<i>Idade (anos)</i>	31 (54-18)	32 (45-23)
<i>Gênero</i>	25 M; 5 F	5 M; 15 F
<i>Reação de Montenegro (média mm<sup>2</sup>)</i>	17x13	–

## 6.2. Análise da expressão *ex-vivo* dos TLR2 e TLR4 na população de monócitos

Monócitos do sangue de pacientes com LC (n=10) e de indivíduos saudáveis (n=10) foram marcados com anticorpos anti-CD14, anti-CD16, e anti-TLR2 ou anti-TLR4, e a expressão *ex-vivo* dos receptores *toll-like* 2 e 4 foi avaliada por citometria de fluxo.

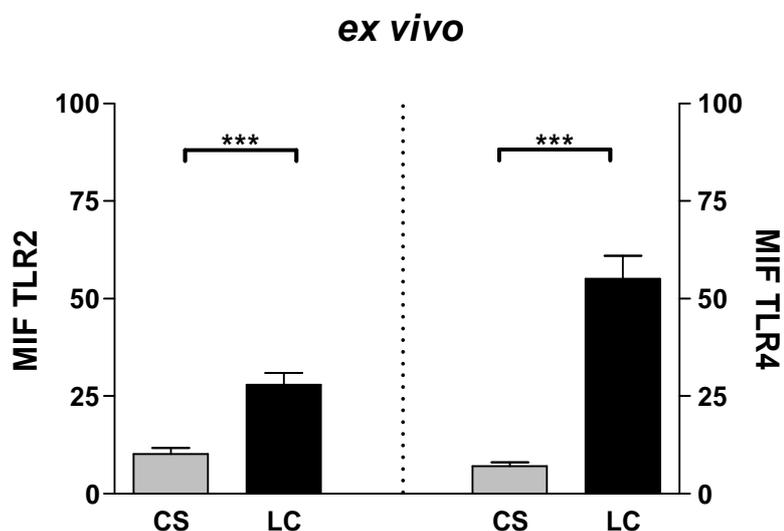
Inicialmente, os monócitos do sangue recém-colhido foram avaliados de acordo com tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H), como pode ser observado na **figura 5**. Para confirmar o isolamento da população de monócitos, estes foram identificados de acordo com a marcação dos anticorpos anti-CD14 e anti-CD16. Em seguida, foi avaliada a expressão dos receptores *toll-like*.



**Figura 5 - Expressão *ex-vivo* dos receptores *toll-like* 2 e 4 nos monócitos de pacientes com LC e indivíduos saudáveis. Representação gráfica da estratégia utilizada para identificar a população de monócitos e os receptores *toll-like* 2 e 4 por citometria de fluxo, mediante a utilização dos anticorpos monoclonais anti-CD16, -CD14 e anti-TLR2 ou -TLR4.**

### 6.2.1. Expressão *ex-vivo* dos receptores *toll-like* 2 e 4 nos monócitos CD14<sup>+</sup> de pacientes com LC e indivíduos sadios.

A expressão *ex-vivo* dos receptores *toll-like* 2 e *toll-like* 4 foi superior nos monócitos de pacientes com LC em relação à expressão nos monócitos de indivíduos sadios (**Figura 6**).



**Figura 6 - Expressão *ex-vivo* dos TLRs 2 e 4 em monócitos humanos.** A expressão *ex-vivo* de TLR2 e de TLR4 foi avaliada nos monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=10, coluna preta) e de indivíduos sadios (n=10, coluna cinza) através da marcação com anti-CD14, -CD16 e anti-TLR2 ou -TLR4, por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF). Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ).

### 6.2.2. Frequência das subpopulações de monócitos em pacientes com LC e em indivíduos saudáveis.

Para analisar possíveis alterações nas proporções das subpopulações de monócitos no sangue periférico dos pacientes com LC, após os monócitos serem avaliados de acordo com tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H), como pode ser observado na **figura 5**, as subpopulações de monócitos foram separadas de acordo com a marcação dos anticorpos anti-CD14 e anti-CD16.

Nos pacientes, a porcentagem da subpopulação de monócitos de pacientes com LC expressando CD16 (Intermediários CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> e não clássicos CD14<sup>low</sup>CD16<sup>++</sup>) mostrou-se relativamente aumentada quando comparada com aquela de indivíduos saudáveis. Porém, não foi atestada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (**Tabela 2**).

**Tabela 2: Subpopulações de monócitos nos pacientes com leishmaniose cutânea**

Condição	Pacientes	Percentual de monócitos totais (%) *		
		Clássicos	Intermediários	Não clássicos
<i>Ex-vivo</i>	LC (n=10)	65.7 ± 10.8	2.8 ± 3.3	12.2 ± 5.3
	CS (n=10)	74.4 ± 15	2.2 ± 1.6	7.1 ± 6.5

\* Resultados expressos em média e desvio padrão.

### 6.2.3. Expressão *ex-vivo* dos receptores *toll-like* 2 e 4 nas diferentes subpopulações de monócitos.

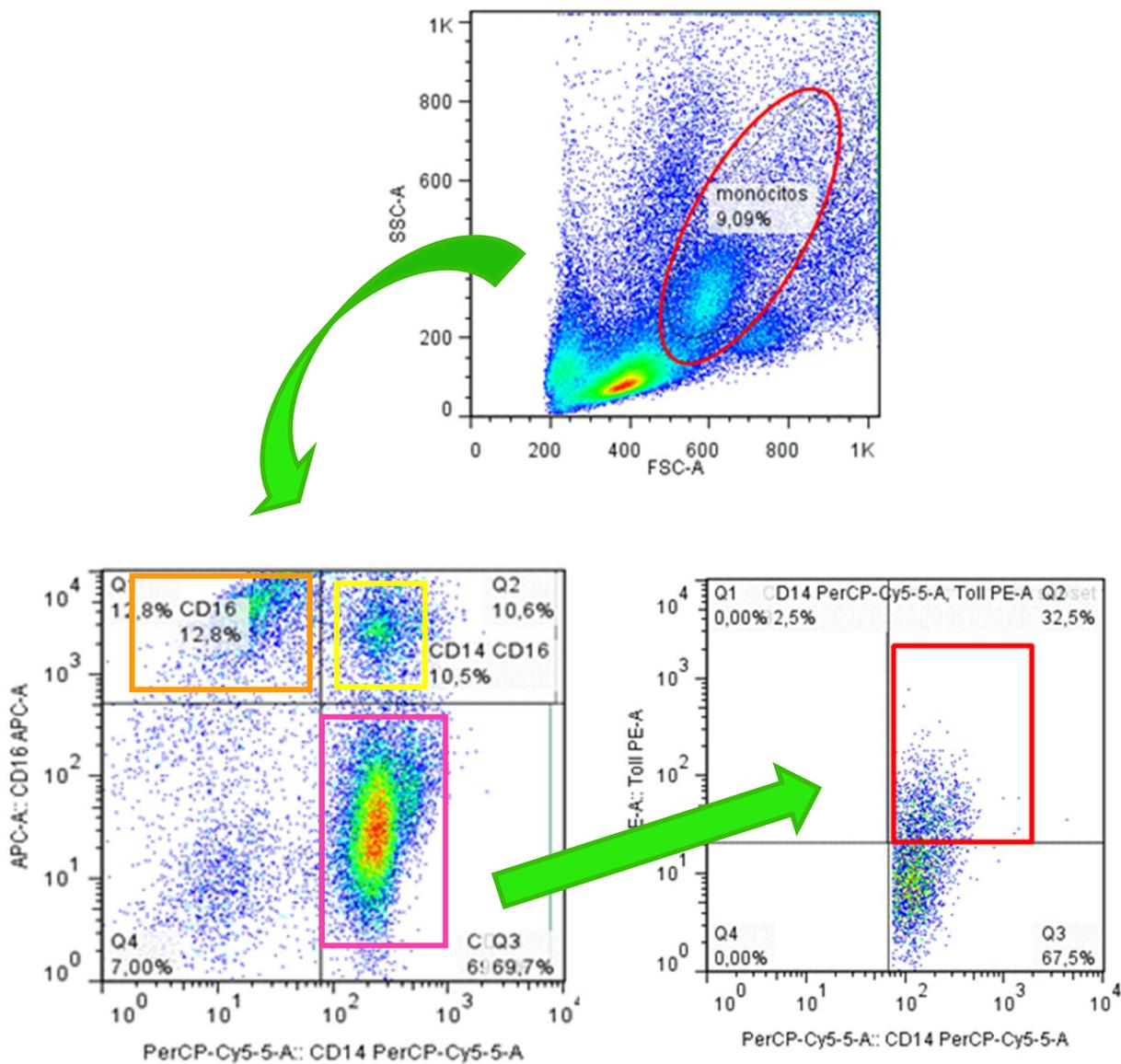
A expressão *ex-vivo* dos receptores *toll-like* 2 e 4 foi comparada entre as distintas subpopulações de monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=10) e indivíduos sadios (n=10).

A representação gráfica da estratégia utilizada para identificar as subpopulações de monócitos, assim como a expressão dos receptores *toll-like*, está apresentada na **figura 7**.

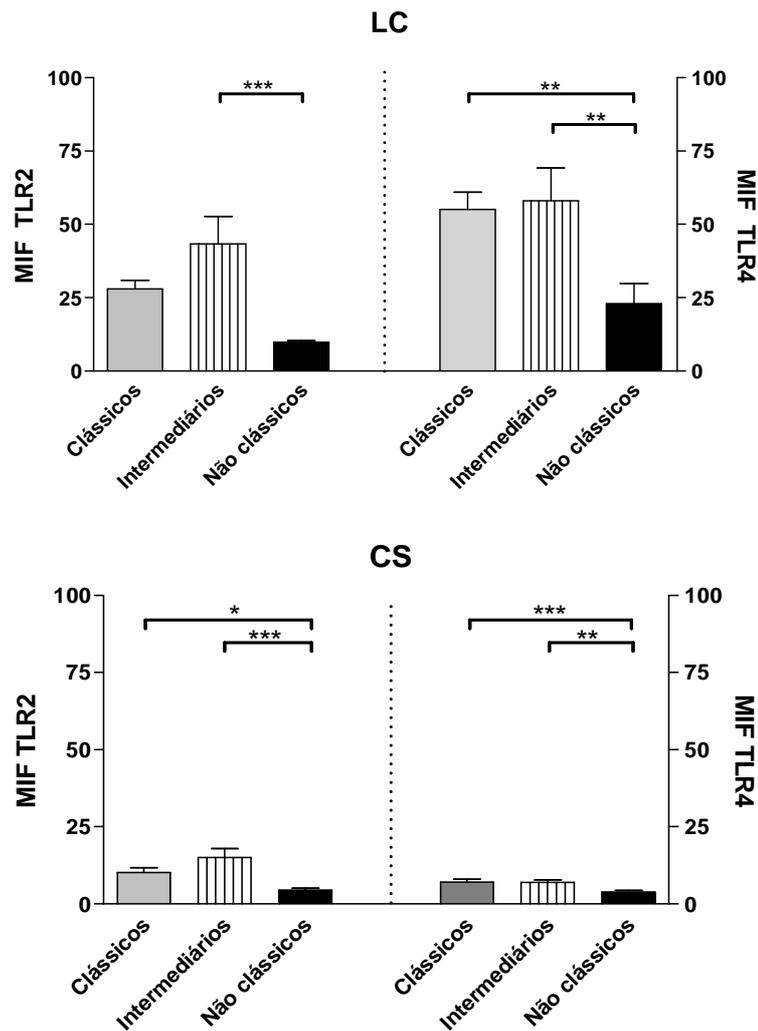
Monócitos intermediários (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>) apresentam expressão *ex-vivo* significativamente maior de TLR2 e de TLR4 em relação aos monócitos não clássicos (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>), tanto nos pacientes com LC (n=10) quanto nos indivíduos sadios (n=10) (**Figura 8**).

Nos indivíduos sadios, os monócitos clássicos (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>) apresentaram expressão *ex-vivo* de TLR2 e de TLR4 significativamente maior em relação aos monócitos não clássicos (Figura 8). Nos pacientes com LC, os monócitos clássicos apresentaram uma expressão *ex-vivo* significativamente maior apenas de TLR4 em relação aos monócitos não clássicos (**Figura 8**).

Não foi atestada diferença significativa da expressão de TLR2 e de TLR4 entre os monócitos clássicos e intermediários, em ambos os grupos (**Figura 8**).

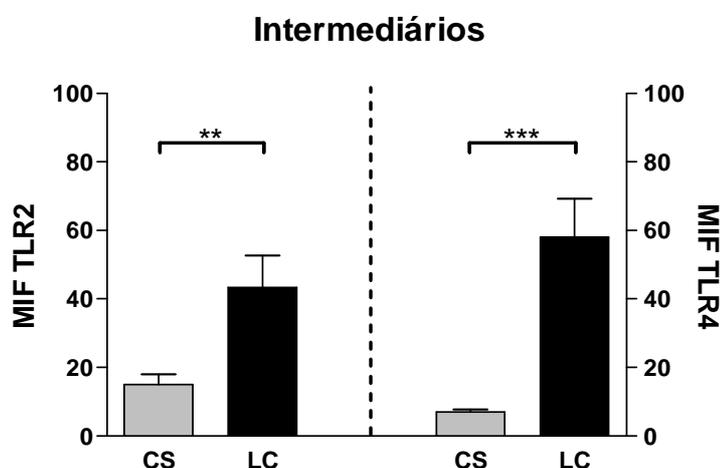


**Figura 7 - Expressão *ex-vivo* dos receptores *toll-like* 2 e 4 nas subpopulações de monócitos de pacientes com LC e indivíduos saudios.** Representação gráfica da estratégia utilizada para identificar as subpopulações de monócitos e os receptores *toll-like* 2 e 4 expressos por cada subpopulação, por citometria de fluxo, mediante a utilização dos anticorpos monoclonais anti-CD16, -CD14 e anti-TLR2 ou -TLR4.



**Figura 8 - Expressão *ex-vivo* dos TLRs 2 e 4 nas subpopulações de monócitos.** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=10) e indivíduos saudáveis (n=10) foram marcados com anti-CD14, -CD16 e anti-TLR2 ou -TLR4. A expressão *ex-vivo* de TLR2 e TLR4 nas subpopulações de monócitos foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) de cada molécula. Todos os valores de *p* foram obtidos através de ANOVA, com pós-teste de *Bonferroni's* (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01 e \*\*\**p*<0.001).

Uma vez que a expressão *ex-vivo* dos TLRs 2 e 4 foi maior nos monócitos intermediários em relação às outras subpopulações, analisamos a diferença entre a expressão *ex-vivo* destes receptores nos monócitos intermediários de pacientes com LC em relação à expressão *ex-vivo* nos monócitos intermediários de indivíduos saudios. A expressão *ex-vivo* dos TLR2 e TLR4 é significativamente maior nos monócitos de pacientes com LC do que nos monócitos de indivíduos saudios (**Figura 9**).



**Figura 9 - Expressão *ex-vivo* dos receptores *toll-like* 2 e 4 nos monócitos intermediários de pacientes com LC e indivíduos saudios.** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=10) e indivíduos saudios (n=10) foram marcados com anti-CD14, -CD16 e anti-TLR2 ou -TLR4. A expressão *ex-vivo* de TLR2 e TLR4 nas subpopulações de monócitos foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) de cada molécula. A análise estatística foi realizada através do teste de Mann Whitney (\*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.0001).

### **6.3. Avaliação da expressão *in vitro* dos receptores TLR2 e TLR4 após infecção de monócitos humanos com *L. braziliensis*.**

Após avaliar a expressão ex-vivo dos receptores *toll-like* 2 e 4 em monócitos do sangue periférico, avaliamos esta expressão em monócitos infectados com parasitos de *L. braziliensis* ou estimulados com LPS (ligante específico para TLR4) ou Pam3Cys (ligante específico para TLR2). Os resultados não mostraram diferença estatisticamente significante entre a expressão dos TLRs 2 e 4 nos monócitos estimulados com os ligantes específicos para os TLRs em relação à sua expressão nos monócitos infectados com parasitos de *L. braziliensis* (Dados não apresentados). A partir daí, nos ativemos à análise da expressão desses receptores apenas nos monócitos infectados com os parasitos de *L. braziliensis*.

Após identificar as subpopulação de monócitos de acordo com a marcação dos anticorpos anti-CD14 e anti-CD16, isolamos os monócitos que foram infectados e que não foram infectados através da marcação dos parasitos com CFSE. Em seguida, avaliamos a expressão dos receptores *toll-like* 2 e 4 em cada grupo.

A representação gráfica da estratégia utilizada para identificar as subpopulações de monócitos infectados, assim como a expressão dos TLRs, está apresentada na **figura 10**.

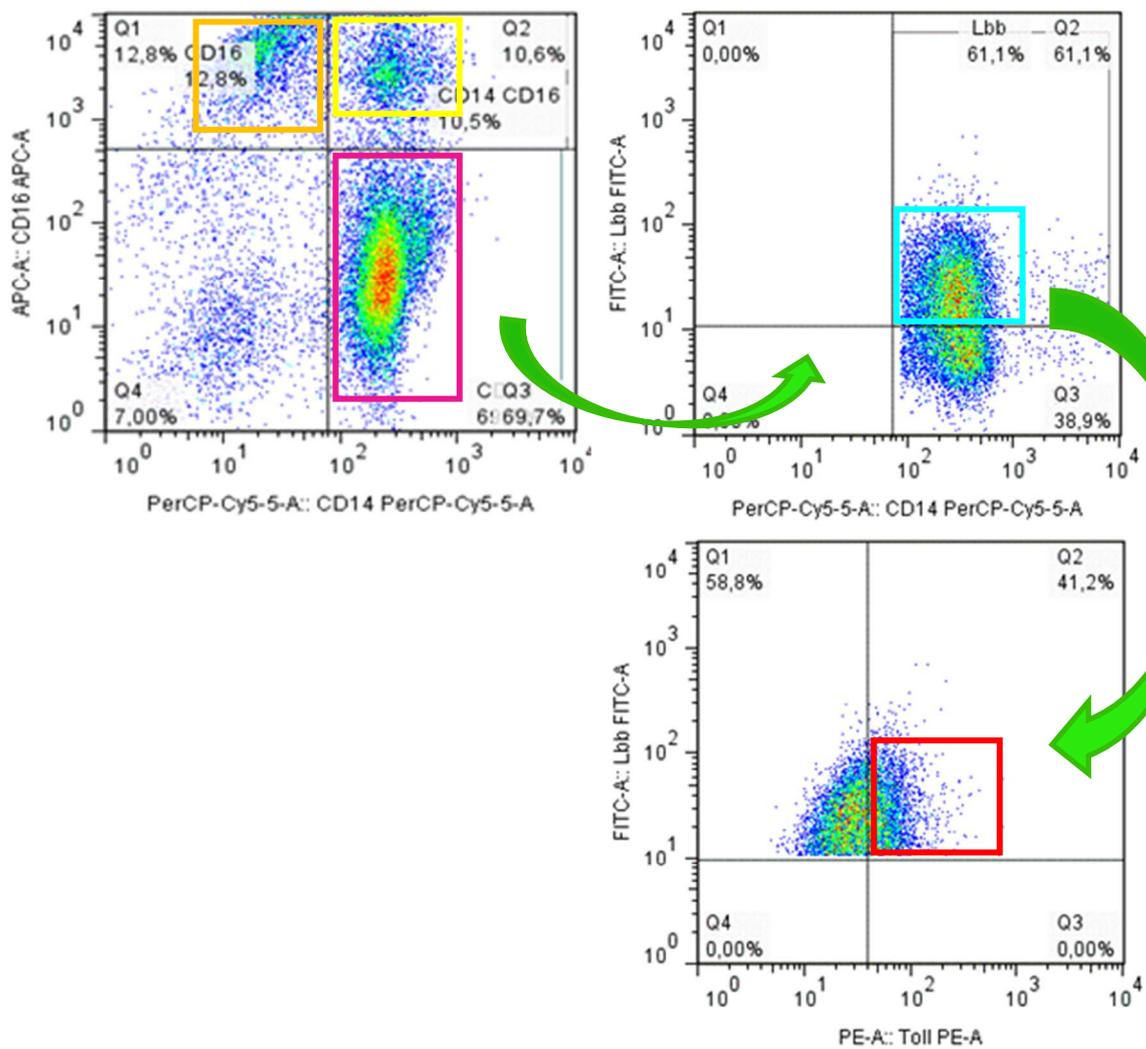
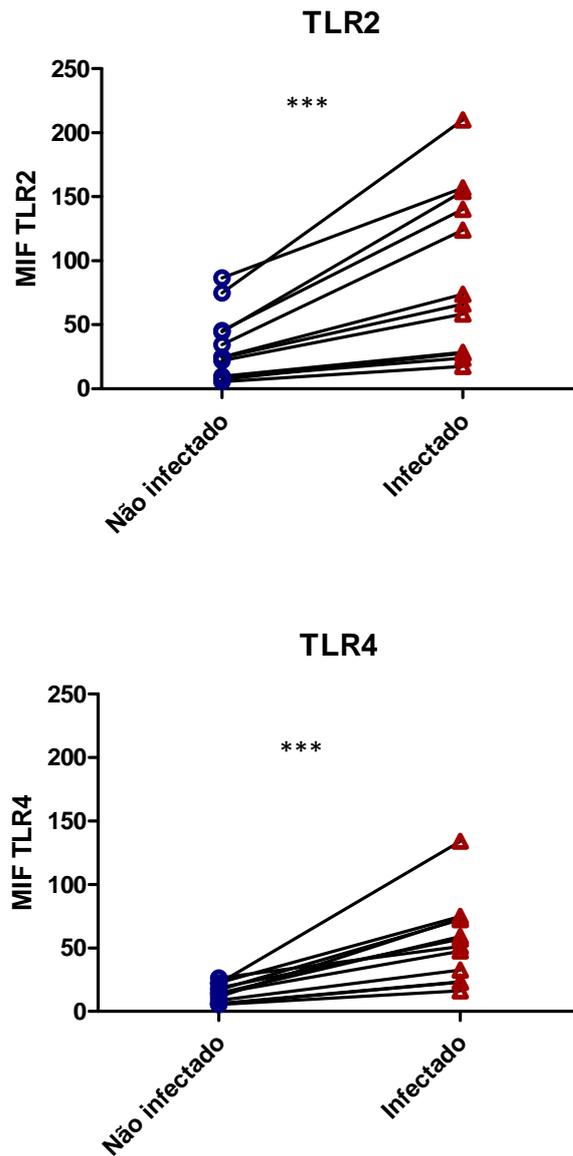


Figura 10 - Representação gráfica da estratégia utilizada para identificar a expressão dos receptores *toll-like* 2 e 4 nos monócitos infectados por *L. braziliensis*. Monócitos do sangue periférico foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com CFSE. Em seguida, os monócitos foram marcados com os anticorpos monoclonais anti-CD16, -CD14 e anti-TLR2 ou -TLR4, e analisados por citometria de fluxo.

### 6.3.1. Expressão *in vitro* dos TLRs 2 e 4 em monócitos de pacientes com LC, infectados com *L. braziliensis*.

Para avaliar o efeito da infecção com *L. braziliensis* na expressão dos receptores *toll-like* 2 e 4, comparamos a expressão destes receptores nos monócitos infectados em relação à expressão nos monócitos que não foram infectados, mas mantidos sob as mesmas condições (mesmo poço da cultura) (ativação *bystander*).

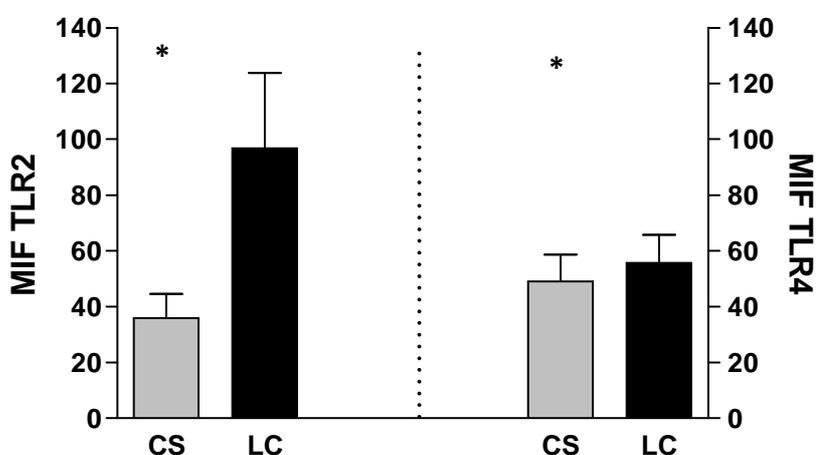
A expressão de TLR2 e de TLR4 nos monócitos infectados foi significativamente maior quando comparada com a expressão desses receptores nos monócitos que não foram infectados pelos parasitos de *L. braziliensis* (**Figura 11**).



**Figura 11 - Expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> de pacientes com LC após infecção com *L. braziliensis*.** Monócitos de pacientes com LC (n=17) foram infectados com *L. braziliensis* marcadas com CFSE e cultivados por 4h. Após, foram tratados com anticorpos anti-CD14, -CD16 e anti-TLR2 ou -TLR4. Os monócitos infectados e não infectado foram avaliados por citometria de fluxo. Os dados estão expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF). A análise estatística foi realizada através do teste t *Student* (\*\*p<0.001).

### 6.3.2. Expressão *in vitro* dos TLRs 2 e 4 em monócitos de pacientes com LC e indivíduos saudáveis, após infecção com *L. braziliensis*.

A expressão dos TLRs 2 e 4 nos monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> de pacientes com LC (n=08) tende a estar aumentada em relação à expressão nos monócitos de indivíduos saudáveis (n=08), porém não foi atestada diferença significativa entre os dois grupos (Figura 12).



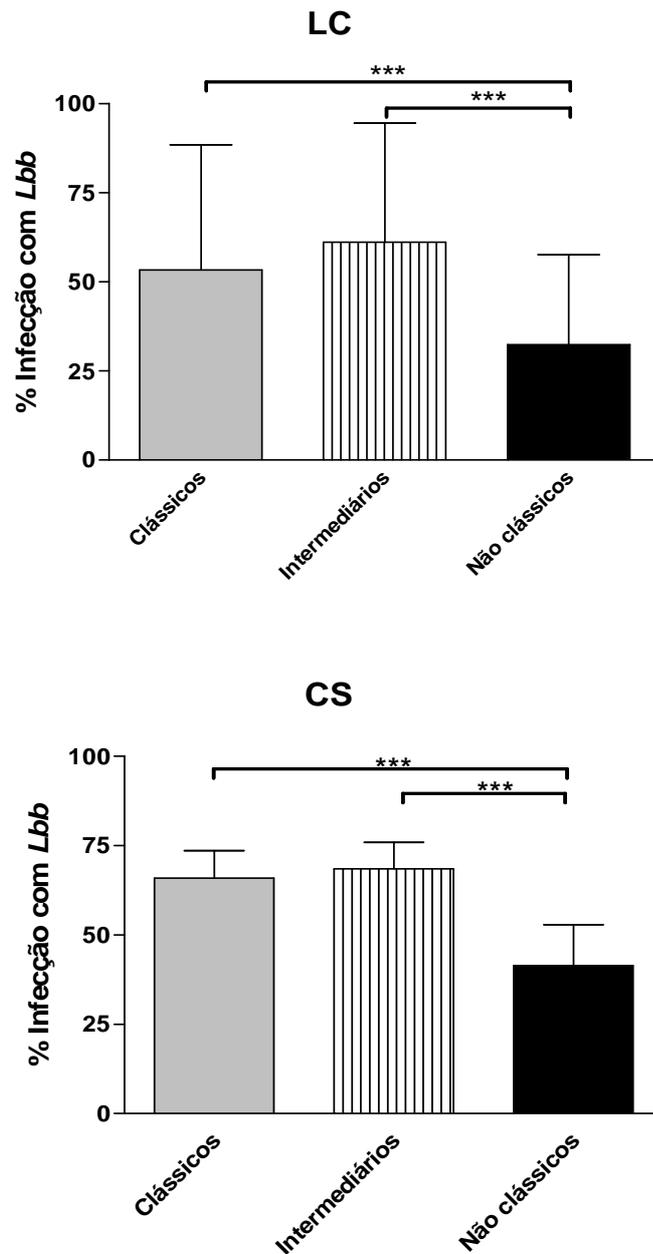
**Figura 12 - Expressão dos receptores *toll-like* 2 e 4 após infecção com *L. braziliensis* de monócitos de pacientes com LC e indivíduos saudáveis.** Monócitos de pacientes com LC (n=08) e CS (n=08) foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com CFSE e cultivados por 4h, a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram marcados com anticorpos anti-CD14, -CD16 e anti-TLR2 ou -TLR4 e avaliados por citometria de fluxo. Os resultados estão representando a média de intensidade de fluorescência (MIF). Para a análise estatística foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* (\*p>0.05).

### **6.3.3. Infecção *in vitro* das subpopulações de monócitos do sangue periférico com promastigotas de *L. braziliensis*.**

Após avaliarmos a expressão dos TLRs 2 e 4 nos monócitos infectados de pacientes com LC em relação à sua expressão nos monócitos de indivíduos saudáveis, partimos para a análise da expressão desses receptores entre as distintas subpopulações de monócitos nos dois grupos estudados.

Em seguida da identificação das subpopulações de monócitos de acordo com a marcação dos anticorpos anti-CD14 e anti-CD16, isolamos os monócitos que foram infectados através da marcação dos parasitos com CFSE. Em seguida, avaliamos o percentual de monócitos infectados em cada subpopulação.

Monócitos clássicos (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>) e intermediários (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>) são mais infectados com promastigotas de *L. braziliensis* do que os monócitos não clássicos (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>), tanto nos pacientes com LC (n=21) quanto nos indivíduos saudáveis (n=10) (**Figura 13**).

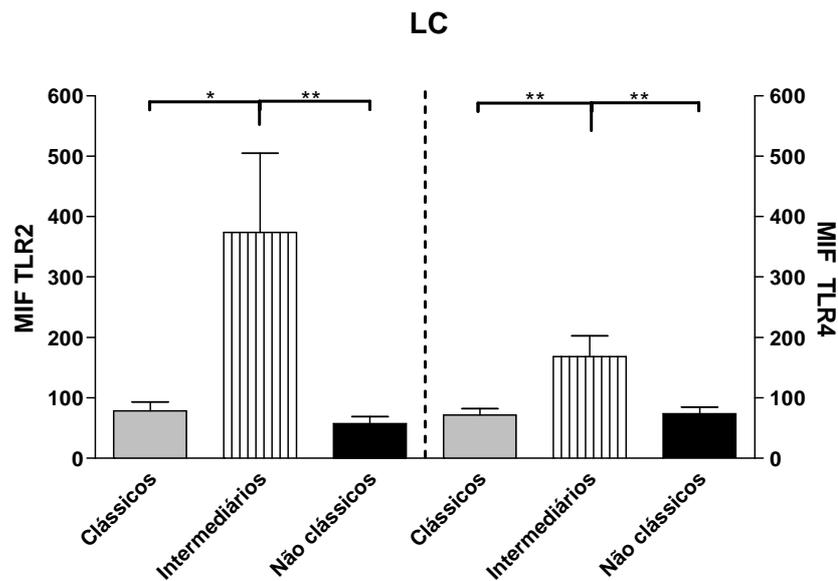


**Figura 13 - Infecção com *L. braziliensis* nas subpopulações de monócitos.** Monócitos de pacientes com LC (n=21) e CS (n=08) foram infectados com parasitos marcados com CFSE e cultivados por 4h. A seguir, foram marcados com anti-CD14, -CD16 e anti-TLR2 ou -TLR4 e avaliados por citometria de fluxo. As análises estatísticas foram feitas através de ANOVA, com pós-teste de *Bonferroni's* (\*\*\*) $p < 0.001$ ).

#### **6.3.4. Expressão *in vitro* dos receptores *toll-like* 2 e 4 nas subpopulações de monócitos infectados com promastigotas de *L. braziliensis*.**

Após identificar as subpopulações de monócitos que foram infectados através da marcação dos parasitos com CFSE, avaliamos a expressão dos receptores *toll-like* em cada subpopulação de monócitos infectados nos pacientes com LC.

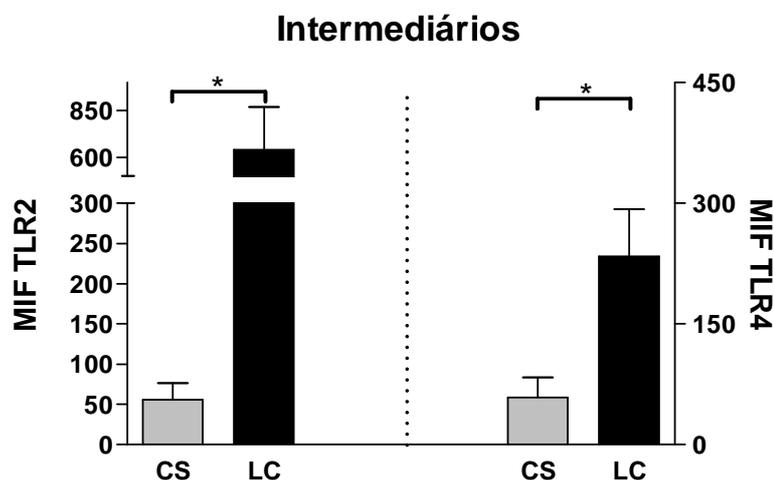
Monócitos intermediários (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>) apresentam expressão significativamente maior de TLR2 e de TLR4 em relação aos monócitos clássicos (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>) e não clássicos (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>), nos pacientes com LC (n=21) (**Figura 14**).



**Figura 14 - Expressão dos receptores *toll-like 2* e *4* nas subpopulações de monócitos infectados com *L. braziliensis*.** Monócitos de pacientes com LC (n=21) foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* e cultivados por 4h, a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD14, -16 e anti-TLR2 ou -TLR4 e analisadas por citometria de fluxo. Os valores estão expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) de cada molécula. Os valores de p foram obtidos através de ANOVA, com pós-teste de Bonferroni's (\*p<0.05 e \*\*p<0.01).

Uma vez que a expressão dos TLRs 2 e 4 foi maior nos monócitos intermediários, analisamos a diferença entre a expressão destes receptores nos monócitos intermediários de pacientes com LC em relação à expressão nos monócitos intermediários de indivíduos sadios, infectados com *L. braziliensis*.

A expressão dos TLRs 2 e 4 é significativamente maior nos monócitos de pacientes com LC do que nos monócitos de indivíduos sadios (**Figura 15**).



**Figura 15 - Expressão de TLR2 e TLR4 nos monócitos intermediários de pacientes com LC e indivíduos sadios, infectados com *L. braziliensis*.**

Monócitos de pacientes com LC (n=08) e de indivíduos sadios (n=08) foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* e cultivados por 4h, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram tratados com anticorpos anti-CD14, -16 e anti-TLR2 ou -TLR4 e analisados por citometria de fluxo. Os valores estão expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF). A análise estatística foi feita pelo teste de *Mann-Whitney* (\*p<0.05).

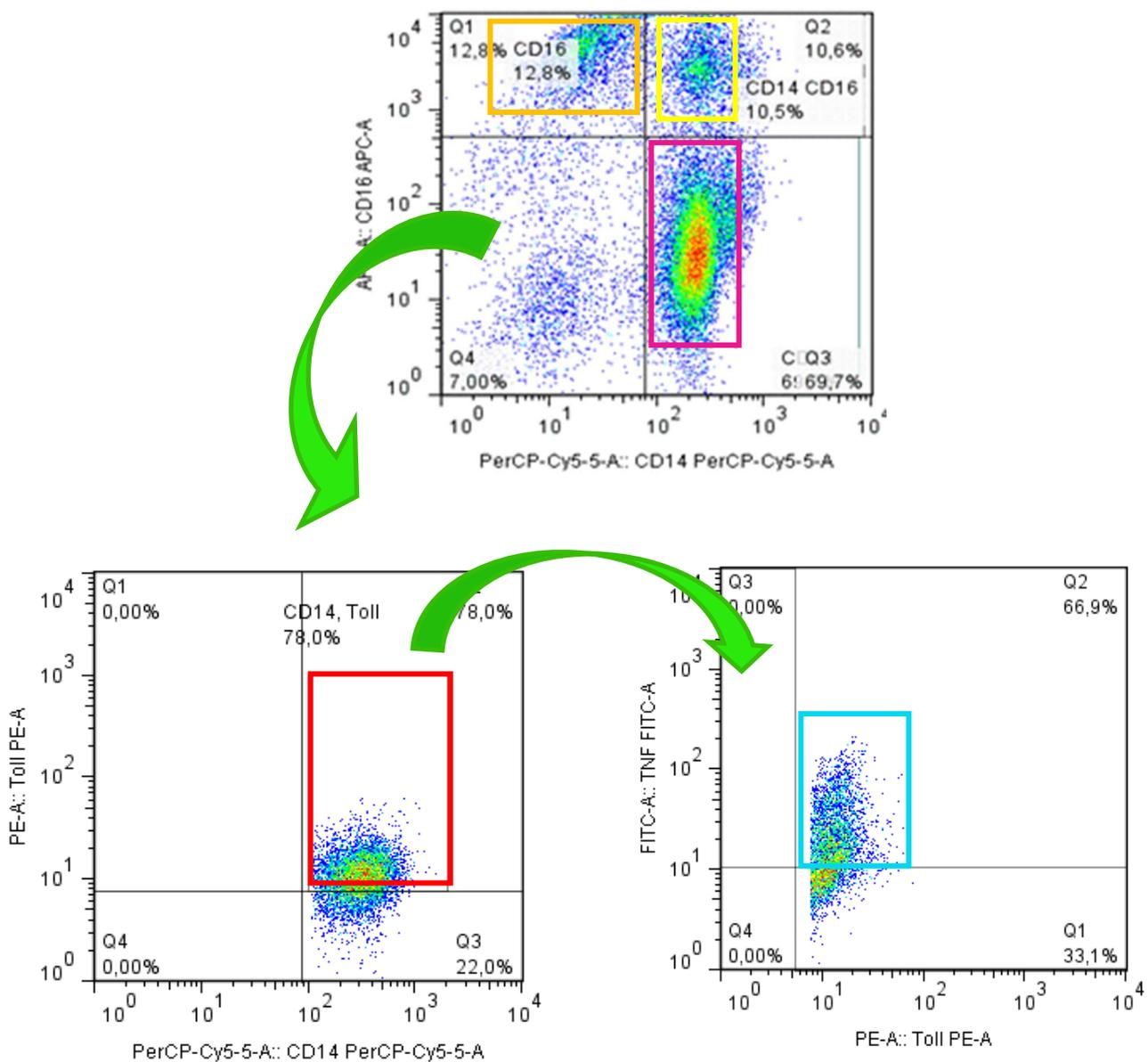
#### **6.4. Avaliação da expressão intracelular de TNF e IL-10 após infecção de monócitos que expressam os TLRs, com *L. braziliensis*.**

Para avaliar se a expressão dos receptores *toll-like* 2 e 4 influencia na ativação dos monócitos e subsequentemente na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, avaliamos a produção intracelular de TNF e de IL-10 nos monócitos que expressam esses receptores.

Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=09) foram cultivados na ausência de estímulo (MEIO) ou após infecção com promastigotas de *L. braziliensis*, durante 8h. Em seguida, as células foram marcadas com anti-CD14 e -CD16, anti-TLR2 ou -TLR4 e fixadas com solução de paraformaldeído 4%. Então, marcadas com -TNF ou -IL-10 e avaliadas através da citometria de fluxo.

A representação gráfica da estratégia utilizada para avaliar a expressão intracelular dessas citocinas nos monócitos que expressam os TLRs 2 e 4 está apresentada na **figura 16**.

Após identificar as subpopulação de monócitos de acordo com a marcação dos anticorpos anti-CD14 e anti-CD16, isolamos os monócitos que expressavam os receptores *toll-like* 2 e 4 através da marcação com os anticorpos monoclonais anti-TLR2 ou anti-TLR4. Em seguida, avaliamos a expressão intracelular das citocinas TNF e IL-10 em cada grupo.

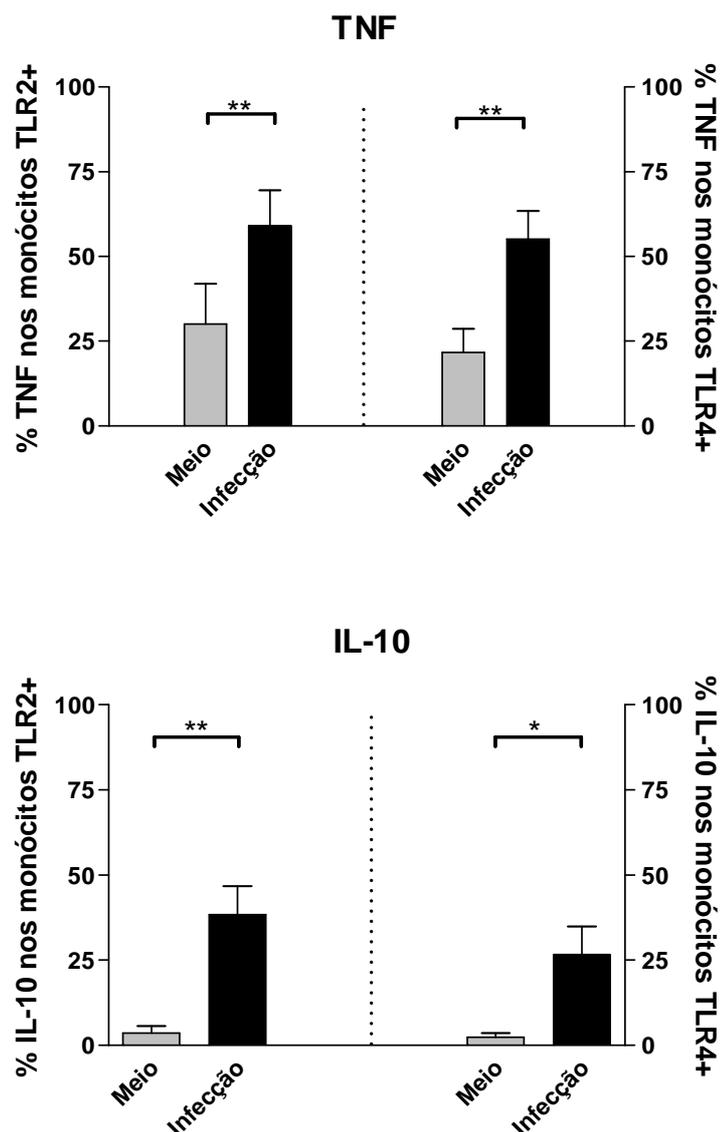


**Figura 16-** Representação gráfica da estratégia utilizada para identificar a expressão intracelular de TNF e IL-10 em monócitos expressando os receptores *toll-like* 2 e 4. Monócitos do sangue periférico foram cultivados na ausência de estímulo ou após infecção com promastigotas de *L. braziliensis*, por 8h. Em seguida, foram marcados com os anticorpos monoclonais anti-CD16 e -CD14, anti-TLR2 ou -TLR4, e anti-TNF ou -IL-10, e analisados por citometria de fluxo.

#### **6.4.1. Expressão intracelular de TNF e IL-10 em monócitos de pacientes com LC infectados com *L. braziliensis* e que expressam os receptores *toll-like* 2 e 4.**

Após a identificação dos monócitos de acordo com a marcação dos anticorpos anti-CD14 e anti-CD16, isolamos os monócitos que expressavam os receptores *toll-like* 2 ou 4. Em seguida, avaliamos a expressão intracelular das citocinas.

Após infecção com *L. braziliensis*, ocorreu um aumento significativo na expressão intracelular de TNF e de IL-10, tanto nos monócitos que expressavam TLR2, quanto nos monócitos que expressavam TLR4 (**Figura 17**).



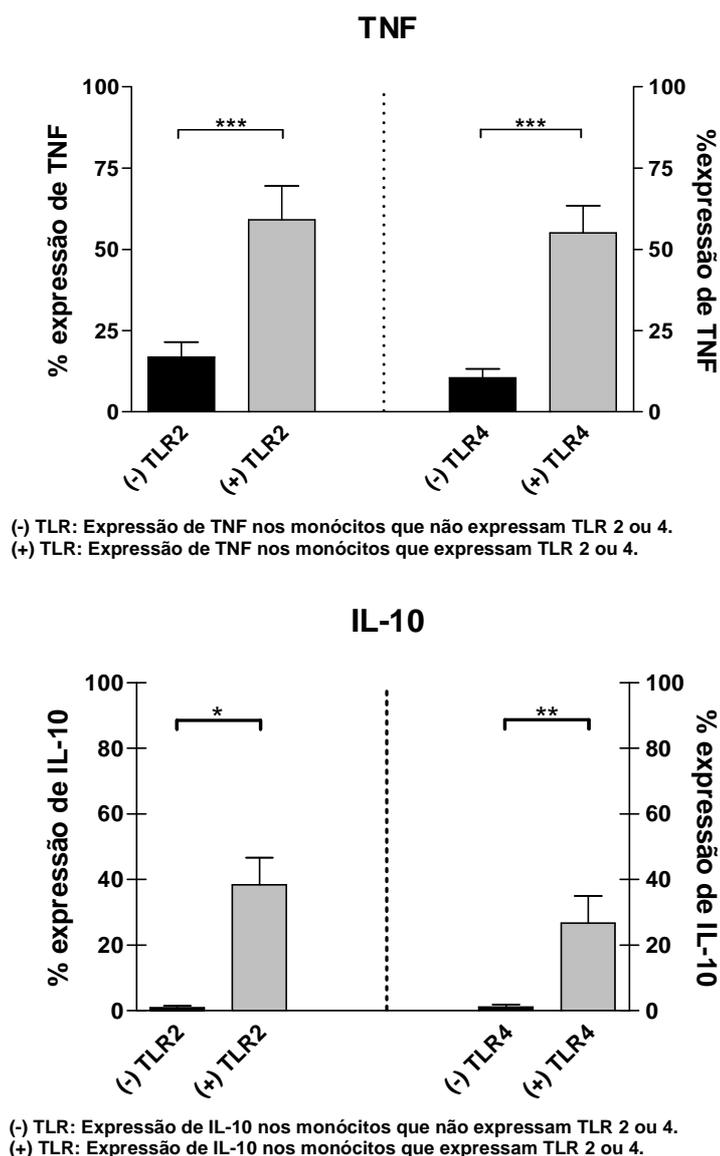
**Figura 17 - Expressão intracelular de TNF e IL-10 em monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> infectados com *L. braziliensis*.** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=09) foram cultivados na ausência de estímulo ou após infecção, por 8h. Em seguida, foram marcados com anticorpos anti-CD14 e -CD16, -TLR2 ou -TLR4 e anti-TNF ou -IL-10 e analisadas por citometria de fluxo. As análises estatísticas foram realizadas através do teste t *Student* (\*p<0.05 e \*\*p<0.01);

#### **6.4.2. Expressão intracelular de TNF e IL-10 em monócitos de pacientes com LC que expressam ou não os receptores *toll-like* 2 e 4, após infecção com *L. braziliensis*.**

Uma vez que observamos que a expressão intracelular de TNF e IL-10 aumentava após infecção com *L. braziliensis*, resolvemos comparar a expressão intracelular destas citocinas entre os monócitos de pacientes com LC (n=09) que expressam os receptores *toll-like* 2 e 4 em relação aos que não expressam estes receptores (**Figura 18**).

Após a identificação dos monócitos de acordo com a marcação dos anticorpos anti-CD14 e anti-CD16, isolamos os monócitos que expressavam e os que não expressavam os receptores *toll-like* 2 ou 4. Em seguida, avaliamos a expressão intracelular de TNF e de IL-10 em cada grupo.

Tanto a expressão intracelular de TNF quanto a de IL-10 foram significativamente maiores nos monócitos que expressam tanto TLR2 quanto TLR4 do que naqueles que não expressam tais receptores (**Figura 18**).



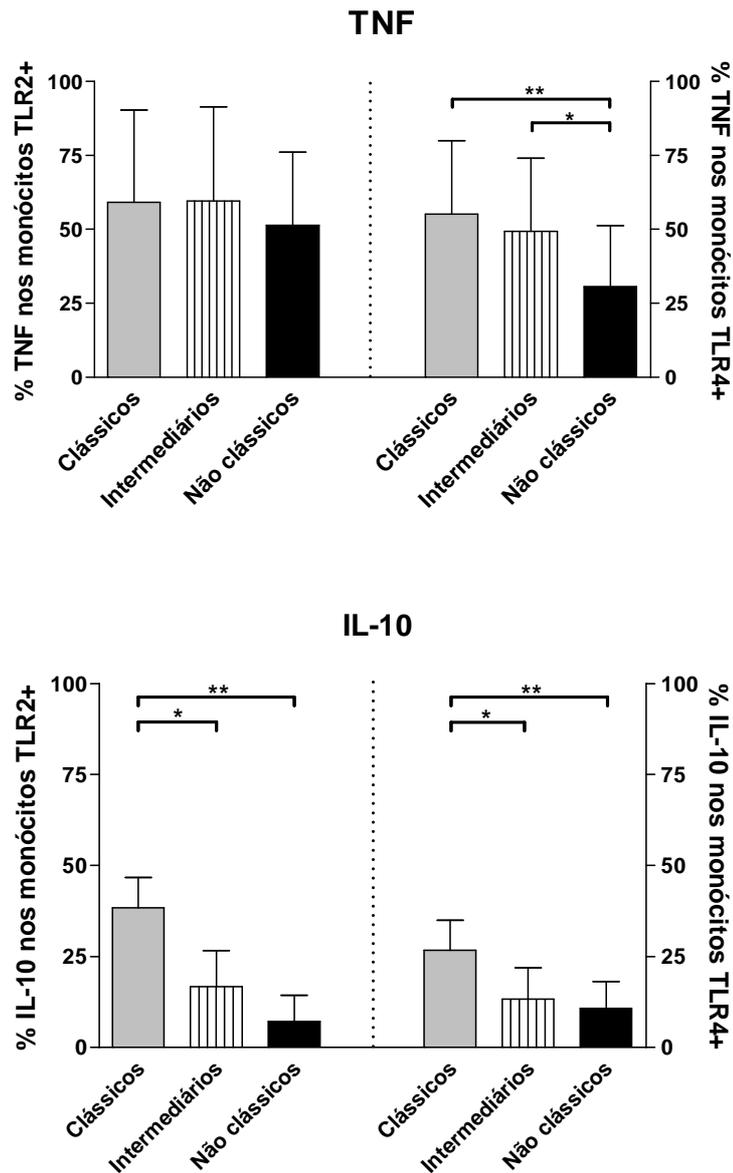
**Figura 18 - Expressão intracelular de TNF e IL-10 em monócitos expressando ou não os TLRs 2 e 4, após infecção com *L. braziliensis*.** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=09) foram cultivados após infecção com *L. braziliensis*, por 8h à 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram marcados com anticorpos anti-CD14 e -CD16, anti-TLR2 ou -TLR4 e anti-TNF ou -IL-10 e analisados por citometria de fluxo. As análises estatísticas foram realizadas através do teste t Student (\*p<0.05, \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.0001).

### **6.4.3. Expressão intracelular de TNF e IL-10 nas subpopulações de monócitos de pacientes com LC, após infecção com *L. braziliensis*.**

Após a identificação das subpopulações de monócitos de acordo com a marcação dos anticorpos anti-CD14 e anti-CD16, isolamos os monócitos que expressavam os receptores *toll-like* 2 ou 4. Em seguida, avaliamos a expressão intracelular de TNF e de IL-10 em cada subpopulação.

Monócitos clássicos (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>) e intermediários (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>) **TLR4**<sup>+</sup> apresentam uma expressão significativamente maior de TNF quando comparados com os monócitos não clássicos (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>). Os monócitos **TLR2**<sup>+</sup> não mostraram diferença significativa entre si em relação à expressão intracelular de TNF (**Figura 19**).

Por outro lado, a expressão de IL-10 foi significativamente maior nos monócitos clássicos, tanto **TLR2**<sup>+</sup> quanto **TLR4**<sup>+</sup>, em relação aos monócitos intermediários e aos monócitos não clássicos (**Figura 19**).

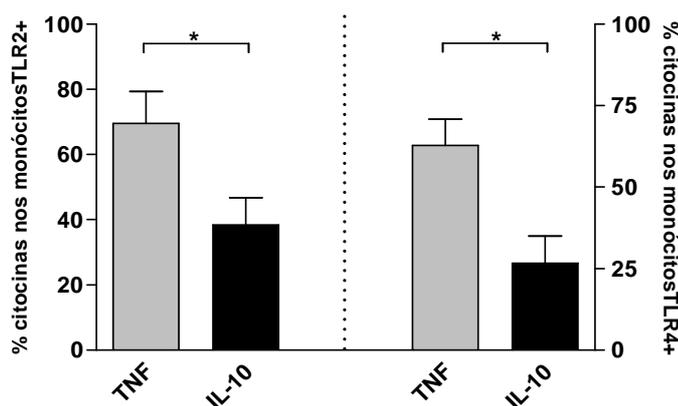


**Figura 19 - Expressão intracelular de TNF e IL-10 nas subpopulações de monócitos expressando os TLRs 2 e 4, após infecção com *L. braziliensis*.** Monócitos de pacientes com LC (n=9) foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* e cultivados por 8h, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram tratados com anticorpos anti-CD14 e -16, anti-TLR2 ou -TLR4, e anti-TNF ou -IL-10 e analisados por citometria de fluxo. Os valores de p foram obtidos através de ANOVA, com pós-teste de *Bonferroni's* (\*p<0.05 e \*\*p<0.01).

#### 6.4.4. Comparação entre a expressão intracelular de TNF e de IL-10 nos monócitos clássicos (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>) de pacientes com LC, infectados com *L. braziliensis*.

Como pode ser observado na **figura 19**, a infecção com *L. braziliensis* induziu significativa expressão tanto de TNF quanto de IL-10 nos monócitos clássicos de pacientes com LC.

Porém, comparando os percentuais de expressão de TNF e IL-10, observamos que a expressão de TNF é significativamente maior do que a expressão de IL-10, tanto nos monócitos clássicos **TLR2<sup>+</sup>** quanto nos **TLR4<sup>+</sup>** (**Figura 20**).



**Figura 20 - Comparação entre a expressão intracelular de TNF e IL-10 nos monócitos clássicos expressando os TLRs 2 e 4.** Monócitos de pacientes com LC (n=9) foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* e cultivados por 8h, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após, foram tratados com anticorpos anti-CD14 e -16, anti-TLR2 ou – TLR4, e anti-TNF ou –IL-10 e analisados por citometria de fluxo. As análises estatísticas foram feitas através do teste t *Student* (\*p<0.05).

## 7. DISCUSSÃO

Macrófagos são cruciais na defesa do hospedeiro, desde a detecção e eliminação do parasito até a indução da resposta imune adaptativa (Mosser *and* Edwards, 2008). Embora as CMSP de pacientes com LC produzam grandes quantidades de IFN- $\gamma$ , principal citocina responsável pela ativação dos macrófagos para matar a *Leishmania*, esses pacientes desenvolvem lesão. Já está bem documentado que a resposta imune adaptativa, através da produção de citocinas pro-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF) pelas células T, está envolvida na forte resposta inflamatória que é responsável pelo desenvolvimento da lesão nesses pacientes (Antonelli et al., 2005; Faria et al., 2005; Oliveira et al., 2011). Neste contexto, a erradicação do parasito ou a ocorrência de formas assintomáticas da doença não podem ser explicadas pela ação efetiva da resposta imune adaptativa, o que salienta a importância da resposta imune inata no controle da infecção.

Embora vários receptores de monócitos/macrófagos evidentemente participem da interação com os parasitos de *Leishmania* (Blackwell, 1985; Brittingham *and* Mosser, 1996; Mosser *and* Brittingham, 1997; Mosser *and* Rosenthal, 1993), ainda não está claro o papel desses receptores na modulação da resposta imune do hospedeiro e no desenvolvimento clínico da infecção. Os modelos animais de leishmaniose já haviam demonstrado a expressão dos TLRs em macrófagos (Antoniazzi et al., 2004; de Veer et al., 2003; Flandin et al., 2006; Gallego et al., 2011; Hawlisch et al., 2005; Hawn et al., 2002; Kropf et al., 2004a; Kropf et al., 2004b). Por outro lado, a expressão desses receptores em monócitos de pacientes com LC ainda não havia sido descrita.

Neste trabalho nós caracterizamos a expressão dos receptores *toll-like* 2 e 4 nas diferentes subpopulações de monócitos de pacientes com LC, tanto *ex-vivo* quanto após infecção com parasitos de *L. braziliensis*. Também avaliamos a expressão de TNF e IL-10 em monócitos de pacientes com LC que expressam esses receptores.

Vários estudos têm demonstrado resultados promissores em relação à importância dos TLRs 2 e 4 na resposta aos parasitos de *Leishmania*. Já está confirmado que o TLR2 é o responsável pelo reconhecimento do LPG, principal componente da parede externa da *Leishmania*, e que ativa células NK humanas e macrófagos murinos (Becker et al., 2003). Os primeiros estudos em camundongos demonstraram que o TLR4 é importante no controle/cura da leishmaniose cutânea por *L. major* (Ajday et al., 2011; Hawlisch et al., 2005; Kropf et al., 2004a; Kropf et al., 2004b), embora não exista um consenso sobre a importância isolada do TLR4 na infecção com *Leishmania*.

Nossos resultados mostraram que a expressão *ex-vivo* tanto do TLR2 quanto do TLR4 é maior nos monócitos de pacientes com LC do que nos monócitos de indivíduos saudáveis. Além disso, a infecção por *L. braziliensis* aumentou a expressão desses receptores nos monócitos de pacientes com LC em comparação aos monócitos de indivíduos saudáveis. Já foi demonstrado que a infecção com *L. chagasi* induz a expressão de mRNA de TLR2 e TLR4 por todo o curso da infecção (Cezario et al., 2011), e que a infecção com *L. panamensis* induz aumento na expressão de TLR2 e TLR4 em macrófagos humanos (Gallego et al., 2011), indicando que estes receptores podem potencialmente estar envolvidos na resposta das células do hospedeiro à *Leishmania*.

Como o reconhecimento de TLRs é frequentemente associado à produção de citocinas da resposta imune inata e à produção de moléculas efetoras adicionais, é importante determinar as consequências da ativação dos receptores *toll-like* durante a infecção por *Leishmania*. Esta relação entre os TLRs com a síntese de citocinas nos motivou a pesquisarmos a expressão intracelular de TNF e IL-10 nos monócitos expressando os receptores *toll-like* 2 e 4, infectados com parasitos de *L. braziliensis*.

Nossos resultados demonstraram que a infecção com *L. braziliensis* induz a expressão intracelular de TNF e de IL-10, e que esta expressão se dá quase que exclusivamente nos monócitos que expressam o TLR2 e o TLR4. Isto provavelmente ocorre pelo fato da cascata de reações desencadeadas pelos TLR2 e TLR4 ser a mesma, porquanto ambos utilizam a mesma porção intracelular (MyD88). Estudos prévios confirmam que o TLR2 reconhece o LPG de *Leishmania* em células NK humanas (Becker et al., 2003), e a inibição da expressão do TLR2 diminui a produção de NO e a secreção de TNF em macrófagos de camundongos estimulados com IFN- $\gamma$  (Flandin et al., 2006).

Até o momento não foram descritos quais antígenos do parasito poderiam se ligar ao TLR4. Entretanto, foi demonstrado que a infecção com *L. pifanoi* P8 PGLC induz a produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos numa via dependente do TLR4 (Whitaker et al., 2008). Macrófagos de camundongos TLR4<sup>-/-</sup> apresentam redução na produção de TNF e aumento da carga parasitária de *L. panamensis*, evidenciando a importância do TLR4 na fase inicial da infecção (Gallego et al., 2011). Outros estudos mostram ainda que há uma correlação positiva entre a expressão de TLR2 e TLR4 com a produção de TNF, IL-17, IL-10, TGF- $\beta$ , NO e a

carga parasitária, que estão aumentadas no início da infecção com *L. chagasi* (Cezario et al., 2011), comprovando a interação do parasito com os TLRs 2 e 4.

Macrófagos e células dendríticas são células importantes da imunidade natural que podem determinar o controle ou a exacerbação da doença. Como os monócitos são os precursores de macrófagos e células dendríticas nos tecidos, e as subpopulações de monócitos diferem entre si quanto a características fenotípicas e funcionais, desempenhando diferentes papéis durante as condições de saúde e doença, a análise do perfil dos receptores *toll-like* nas diferentes subpopulações de monócitos de pacientes com LC, simultaneamente à expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias, pode melhorar a compreensão da sua possível contribuição na patogênese da doença. Neste trabalho, nós encontramos que as subpopulações de monócitos CD16<sup>+</sup>, os monócitos intermediários (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>) e os monócitos não clássicos (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>), mostram uma tendência de estarem aumentadas no sangue periférico de pacientes com LC, embora este resultado não tenha sido estatisticamente significativo. Estes dados corroboram aqueles descritos anteriormente por Soares et al. (2006), embora estes autores tenham avaliado a população total CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, que mostrou-se elevada nos pacientes com LC. Alguns trabalhos em que foram avaliadas as subpopulações de monócitos durante infecções por bactéria, vírus e o protozoário plasmódio (Azeredo et al., 2010; Castano et al., 2011; Han et al., 2009; Ogonda et al., 2010), mostraram o aumento das duas subpopulações de monócitos CD16<sup>+</sup> ou o aumento preferencial dos monócitos intermediários. Este aumento pode estar associado à gravidade das doenças, como é o caso de pacientes infectados com HIV (Han et al., 2009), com sepse ou malária (Ogonda et al., 2010; Skinner et al., 2005; Wong et al., 2012).

Os mecanismos propostos para a participação de monócitos CD16<sup>+</sup> na gravidade das infecções podem envolver maior suscetibilidade de determinadas subpopulações à infecção, o que pode causar a disseminação de microrganismos, eliminação da célula hospedeira ou alteração das funções celulares, ativação por imuno-complexos que se ligam ao CD16 e produção desequilibrada de citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (Castano et al., 2011; Han et al., 2009; Ogonda et al., 2010; Soares et al., 2006). Tal desequilíbrio pode resultar no aumento da gravidade da leishmaniose, uma vez que o desenvolvimento das lesões depende da resposta imune do hospedeiro, ou ainda, do controle ou não da infecção.

De fato, no presente estudo, foi observado que a expressão dos receptores *toll-like* 2 e 4 e a taxa de infecção com parasitos de *L. braziliensis* foram maiores nos monócitos intermediários (CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup>) em comparação às das outras subpopulações. Este resultado está consistente com estudo anterior de Belge et al. (2002), que observou uma média de intensidade de fluorescência do TLR2 duas vezes maior nos monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, embora estes autores tenham avaliado a população total CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. Ainda, Cros et al. (2010) mostraram que, em geral, a resposta pró-inflamatória de monócitos, incluindo a fagocitose e a produção de ROS, MPO, lisozima, e citocinas em resposta aos agonistas de TLR1, TLR2 e TLR4, parece ser mediada por monócitos CD14<sup>high</sup>, ao passo que os monócitos CD14<sup>low</sup>, de alguma forma, exibiram um fenótipo anti-inflamatório num estado estacionário. Estes últimos respondem fracamente à estimulação via TLRs de superfície, mas são especializados na produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF, IL-1 $\beta$ , e de CCL3 em resposta a vírus e ácidos nucleicos, através dos TLRs 7 e 8.

Não há um consenso em relação às citocinas produzidas preferencialmente pelas subpopulações de monócitos. Enquanto Cros et al. (2010) mostraram que os monócitos não clássicos (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) não apresentam boa resposta a LPS, sendo pouco produtores de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-10, Wong et al. (2011) mostraram que estas células são as principais produtoras de TNF e IL-1 $\beta$  após ativação com LPS. Estes últimos resultados estão de acordo com estudos prévios da expressão intracelular de TNF em monócitos não clássicos ativados com LPS (Belge et al., 2002). O trabalho de Wong et al. (2011) não confirmou os resultados de Skrzeczynska-Moncznik et al. (2008) que apontaram os monócitos intermediários como os principais produtores de IL-10. Em contraste, Wong et al. (2011) mostraram que os monócitos clássicos são os principais produtores de IL-10, após ativação com LPS.

Nossos resultados demonstraram que, após infecção com parasitos de *L. braziliensis*, a expressão intracelular de TNF foi maior nos monócitos CD14<sup>high</sup> (clássicos e intermediários) em relação aos monócitos CD14<sup>low</sup> (não clássicos), enquanto que a produção intracelular de IL-10 foi significativamente maior nos monócitos clássicos (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>). Entretanto, nestes monócitos a expressão de TNF foi maior do que a de IL-10. A presença de células duplo-positivas (TNF<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup>) demonstra que uma mesma população de monócitos é capaz de produzir ambas as citocinas pró- e anti-inflamatória. Este dado está de acordo com aqueles publicados por Smedman et al. (2011), mostrando que em resposta a agonistas de TLR2 ou TLR4 várias subpopulações de monócitos com distintos perfis de citocinas podem ser identificados.

Neste estudo, foi avaliada a participação dos receptores *toll-like* 2 e 4 na leishmaniose tegumentar, em pacientes com LC e em indivíduos saudáveis. Foi demonstrado que os pacientes com LC possuem uma maior expressão desses receptores do que os indivíduos saudáveis, indicando que esses receptores estão ativados durante a doença. A expressão dos TLRs 2 e 4 e a expressão intracelular de TNF e IL-10, aumentam após infecção com *L. braziliensis*, o que ratifica a importância destes receptores na resposta imune contra os parasitos. A infecção com parasitos de *L. braziliensis* determina uma maior expressão dos receptores *toll-like* 2 e 4, levando à ativação das vias de sinalização da célula que estão envolvidas na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF. As expressões desses receptores foram analisadas nas três subpopulações de monócitos, mostrando que há um aumento na expressão do TLR2 e TLR4 nos monócitos intermediários (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>), o que aponta para um papel importante dessas células na patogênese da leishmaniose tegumentar. É sugerido que as subpopulações de monócitos podem ter papéis distintos na interação parasito-hospedeiro, através da qual se estabelece a resposta imune.

A observação de que monócitos de pacientes com LC apresentam maior expressão de receptores TLRs 2 e 4, *ex-vivo* e após infecção com *L. braziliensis*, além de maior expressão intracelular de TNF nos monócitos que estão expressando esses receptores, corrobora com as evidências que demonstram que a resposta imune exacerbada observada na LC causada por *L. braziliensis*, com produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF, está associada ao desenvolvimento das lesões.

A imunoterapia representa atualmente uma abordagem promissora no tratamento da leishmaniose tegumentar, já que a droga utilizada é a mesma há 40 anos, além de ser tóxica e apresentar resistência em um grande percentual dos pacientes (Romero et al., 2001). Alguns estudos já mostraram os benefícios do uso de imunomoduladores no tratamento dessa doença. A pentoxifilina, que é um inibidor de TNF, cura pacientes com LM refratários ao tratamento convencional com antimonial pentavalente e acelera a cura de pacientes com LC (Lessa et al., 2001; Machado et al., 2007). Os adjuvantes parecem melhorar a eficácia das vacinas e da imunoterapia pela estimulação da imunidade celular através da ativação dos TLRs (Alderson et al., 2006; Johansen et al., 2005; Wickelgren, 2006). O bloqueio desta via de ativação pode ser uma alternativa para modular a forte resposta inflamatória, que é responsável pela destruição tecidual observada leishmaniose tegumentar.

## 8. SUMÁRIO DE RESULTADOS

1. Monócitos de pacientes com LC apresentam uma maior expressão dos receptores *toll-like 2* e 4, *ex-vivo* e após infecção com *L. braziliensis*, em relação aos monócitos de indivíduos sadios.

2. A expressão dos receptores *toll-like 2* e 4 é maior nos monócitos infectados do que nos monócitos não infectados, sugerindo que a infecção com *L. braziliensis* aumenta a expressão desses receptores.

3. A infecção com *L. braziliensis* aumenta as expressões intracelulares de TNF e de IL-10, que são maiores nos monócitos que expressam TLR2 e TLR4. Entretanto, a expressão de TNF é ainda maior que a de IL-10, o que indica o envolvimento dos referidos receptores na produção daquela citocina.

4. A expressão dos TLRs 2 e 4 é maior nos monócitos intermediários (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>) infectados com *L. braziliensis*, concomitantemente a expressão intracelular de TNF é maior nos monócitos CD14<sup>high</sup>. Isto sugere que estas células podem participar do processo inflamatório que ocorre na leishmaniose cutânea.

## 9. CONCLUSÃO

O aumento da expressão dos receptores *toll-like* 2 e 4 após a infecção com *L. braziliensis* está associado com o aumento da expressão intracelular de TNF, citocina que está envolvida na destruição tecidual observada na leishmaniose cutânea. Isto sugere que a ativação desses receptores contribui para a forte resposta inflamatória envolvida no desenvolvimento da lesão.

A observação de que a subpopulação de monócitos intermediários (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>) é a mais infectada com *L. braziliensis* e a que apresenta uma maior expressão de TLR2 e TLR4, mostra a importância desta subpopulação de células na resposta imune do hospedeiro contra *Leishmania*.

## 10. FUTURAS DIREÇÕES

Os resultados obtidos com o presente trabalho nos motiva a darmos continuidade a esta linha de pesquisa, para ajudar na compreensão do papel dos receptores *toll-like* na patogênese da leishmaniose tegumentar.

No intuito de elucidarmos o mecanismo por meio do qual ocorre a ativação dos TLRs na resposta imune contra os parasitos de *Leishmania*, realizaremos os seguintes experimentos:

1. Avaliar se bloqueio desses receptores interfere na infecção dos monócitos e na produção de TNF e de IL-10.
2. Avaliar o envolvimento dos receptores TLR2, TLR4 e TLR6 na via de sinalização das MAPK e na ativação do fator transcricional NF- $\kappa$ B em monócitos de pacientes com LC infectados com *L.braziliensis*.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, K., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Seki, E., Nakano, H., Takeuchi, O., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Okamura, H., *et al.* (2001). Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *Journal of immunology* 167, 5928-5934.
- Ajdary, S., Ghamilouie, M.M., Alimohammadian, M.H., Riazi-Rad, F., and Pakzad, S.R. (2011). Toll-like receptor 4 polymorphisms predispose to cutaneous leishmaniasis. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 13, 226-231.
- Akira, S., and Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology letters* 85, 85-95.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Alderson, M.R., McGowan, P., Baldrige, J.R., and Probst, P. (2006). TLR4 agonists as immunomodulatory agents. *Journal of endotoxin research* 12, 313-319.
- Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285, 736-739.
- Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., and Team, W.H.O.L.C. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one* 7, e35671.
- Ancuta, P., Liu, K.Y., Misra, V., Wacleche, V.S., Gosselin, A., Zhou, X., and Gabuzda, D. (2009). Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC genomics* 10, 403.
- Antonelli, L.R., Dutra, W.O., Almeida, R.P., Bacellar, O., Carvalho, E.M., and Gollob, K.J. (2005). Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology letters* 101, 226-230.
- Antoniazzi, S., Price, H.P., Kropf, P., Freudenberg, M.A., Galanos, C., Smith, D.F., and Muller, I. (2004). Chemokine gene expression in toll-like receptor-

competent and -deficient mice infected with *Leishmania major*. Infection and immunity 72, 5168-5174.

- Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annual review of immunology 27, 669-692.
- Azeredo, E.L., Neves-Souza, P.C., Alvarenga, A.R., Reis, S.R., Torrentes-Carvalho, A., Zagne, S.M., Nogueira, R.M., Oliveira-Pinto, L.M., and Kubelka, C.F. (2010). Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. Immunology 130, 202-216.
- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro De Jesus, A., Dutra, W.O., Gollob, K.J., and Carvalho, E.M. (2002). Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. Infection and immunity 70, 6734-6740.
- Baldrige, J.R., McGowan, P., Evans, J.T., Cluff, C., Mossman, S., Johnson, D., and Persing, D. (2004). Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. Expert opinion on biological therapy 4, 1129-1138.
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A.P., Cabrera, N., et al. (2003). *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. Mol Biochem Parasitol 130, 65-74.
- Belge, K.U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., and Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. Journal of immunology 168, 3536-3542.
- Belkaid, Y., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Rowton, E., Sacks, D.L., and Ribeiro, J.M. (2000). Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 6704-6709.

- Bell, J.K., Mullen, G.E., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R., and Segal, D.M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in immunology* 24, 528-533.
- Bhattacharya, P., Bhattacharjee, S., Gupta, G., Majumder, S., Adhikari, A., Mukherjee, A., Majumdar, S.B., Saha, B., and Majumdar, S. (2010). Arabinosylated lipoarabinomannan-mediated protection in visceral leishmaniasis through up-regulation of toll-like receptor 2 signaling: an immunoprophylactic approach. *The Journal of infectious diseases* 202, 145-155.
- Bittencourt, A.L., and Barral, A. (1991). Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 86, 51-56.
- Blackwell, J.M. (1985). Role of macrophage complement and lectin-like receptors in binding *Leishmania* parasites to host macrophages. *Immunology letters* 11, 227-232.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., and Diefenbach, A. (2000). The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological reviews* 173, 17-26.
- Bomfim, G., Nascimento, C., Costa, J., Carvalho, E.M., Barral-Netto, M., and Barral, A. (1996). Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 84, 188-194.
- Bosque, F., Saravia, N.G., Valderrama, L., and Milon, G. (2000). Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scandinavian journal of immunology* 51, 533-541.
- Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., *et al.* (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285, 732-736.
- Brittingham, A., and Mosser, D.M. (1996). Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitology today* 12, 444-447.
- Calvopina, M., Barroso, P.A., Marco, J.D., Korenaga, M., Cooper, P.J., Nonaka, S., and Hashiguchi, Y. (2006). Efficacy of vaccination with a combination of

*Leishmania* amastigote antigens and the lipid A-analogue ONO-4007 for immunoprophylaxis and immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in a murine model of New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 24, 5645-5652.

Campos, M.A., Almeida, I.C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E.P., Procopio, D.O., Travassos, L.R., Smith, J.A., Golenbock, D.T., and Gazzinelli, R.T. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *Journal of immunology* 167, 416-423.

Carvalho, E.M., Bacellar, O.A., Reed, S., Barral, A., and Rocha, H. (1988). Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill *leishmania*. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 21, 85-92.

Carvalho, E.M., Barral, A., Costa, J.M., Bittencourt, A., and Marsden, P. (1994). Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica* 56, 315-325.

Castano, D., Garcia, L.F., and Rojas, M. (2011). Increased frequency and cell death of CD16<sup>+</sup> monocytes with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis* 91, 348-360.

Cezario, G.A., de Oliveira, L.R., Peresi, E., Nicolete, V.C., Polettini, J., de Lima, C.R., Gatto, M., and Calvi, S.A. (2011). Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 106, 573-583.

Chandra, D., and Naik, S. (2008). *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clinical and experimental immunology* 154, 224-234.

Chang, Z.L. (2010). Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 59, 791-808.

Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., *et al.* (2010). Human CD14<sup>dim</sup> monocytes

patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375-386.

- Cupolillo, E., Grimaldi, G., Jr., and Momen, H. (1994). A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 50, 296-311.
- de Veer, M.J., Curtis, J.M., Baldwin, T.M., DiDonato, J.A., Sexton, A., McConville, M.J., Handman, E., and Schofield, L. (2003). MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *European journal of immunology* 33, 2822-2831.
- Faria, D.R., Gollob, K.J., Barbosa, J., Jr., Schriefer, A., Machado, P.R., Lessa, H., Carvalho, L.P., Romano-Silva, M.A., de Jesus, A.R., Carvalho, E.M., *et al.* (2005). Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and immunity* 73, 7853-7859.
- Fingerle, G., Pforte, A., Passlick, B., Blumenstein, M., Strobel, M., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1993). The novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82, 3170-3176.
- Flandin, J.F., Chano, F., and Descoteaux, A. (2006). 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* 36, 411-420.
- (FUNASA) Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde; Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. (2000). Ed. Brasília. 62p.
- Gallego, C., Golenbock, D., Gomez, M.A., and Saravia, N.G. (2011). Toll-like receptors participate in macrophage activation and intracellular control of *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Infection and immunity* 79, 2871-2879.
- Gazzinelli, R.T., and Denkers, E.Y. (2006). Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature reviews Immunology* 6, 895-906.
- Gazzinelli, R.T., Ropert, C., and Campos, M.A. (2004). Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunological reviews* 201, 9-25.

- Gordon, M.A., Jack, D.L., Dockrell, D.H., Lee, M.E., and Read, R.C. (2005). Gamma interferon enhances internalization and early nonoxidative killing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by human macrophages and modifies cytokine responses. *Infection and immunity* 73, 3445-3452.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927-930.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology* 5, 953-964.
- Grimaldi, G., Jr., and Tesh, R.B. (1993). Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews* 6, 230-250.
- Grimaldi, G., Jr., Tesh, R.B., and McMahon-Pratt, D. (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 41, 687-725.
- Guerra, C.S., Silva, R.M., Carvalho, L.O., Calabrese, K.S., Bozza, P.T., and Corte-Real, S. (2010). Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. *International journal of experimental pathology* 91, 451-459.
- Guy, R.A., and Belosevic, M. (1993). Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infection and immunity* 61, 1553-1558.
- Han, J., Wang, B., Han, N., Zhao, Y., Song, C., Feng, X., Mao, Y., Zhang, F., Zhao, H., and Zeng, H. (2009). CD14<sup>(high)</sup>CD16<sup>(+)</sup> rather than CD14<sup>(low)</sup>CD16<sup>(+)</sup> monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 52, 553-559.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.
- Hawlish, H., Belkaid, Y., Baelder, R., Hildeman, D., Gerard, C., and Kohl, J. (2005). C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. *Immunity* 22, 415-426.

- Hawn, T.R., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Buckner, F.S., Akira, S., and Aderem, A. (2002). *Leishmania major* activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4, 763-771.
- Hepburn, N.C. (2003). Cutaneous leishmaniasis: current and future management. *Expert review of anti-infective therapy* 1, 563-570.
- Hondowicz, B., and Scott, P. (1999). Influence of host and parasite factors on the innate immune response and Th2 stability following infection with *Leishmania major*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1, 65-71.
- Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Ottesen, E., Ehrlich Sachs, S., and Sachs, J.D. (2006). Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS medicine* 3, e102.
- Hotez, P.J., Remme, J.H., Buss, P., Alleyne, G., Morel, C., and Breman, J.G. (2004). Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 38, 871-878.
- Johansen, P., Senti, G., Martinez Gomez, J.M., Storni, T., von Beust, B.R., Wuthrich, B., Bot, A., and Kundig, T.M. (2005). Toll-like receptor ligands as adjuvants in allergen-specific immunotherapy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35, 1591-1598.
- Jones, T.C., Johnson, W.D., Jr., Barretto, A.C., Lago, E., Badaro, R., Cerf, B., Reed, S.G., Netto, E.M., Tada, M.S., Franca, T.F., *et al.* (1987). Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *The Journal of infectious diseases* 156, 73-83.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115-122.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine* 13, 460-469.

- Kedzierski, L., Montgomery, J., Curtis, J., and Handman, E. (2004). Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 52, 104-112.
- Kropf, P., Freudenberg, M.A., Modolell, M., Price, H.P., Herath, S., Antoniazzi, S., Galanos, C., Smith, D.F., and Muller, I. (2004a). Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and immunity* 72, 1920-1928.
- Kropf, P., Freudenberg, N., Kalis, C., Modolell, M., Herath, S., Galanos, C., Freudenberg, M., and Muller, I. (2004b). 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* 76, 48-57.
- Lainson, R., Ryan, L., and Shaw, J.J. (1987). Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 82, 421-424.
- Lessa, H.A., Machado, P., Lima, F., Cruz, A.A., Bacellar, O., Guerreiro, J., and Carvalho, E.M. (2001). Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 65, 87-89.
- Liew, F.Y. (2002). T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nature reviews Immunology* 2, 55-60.
- Liew, F.Y., and Cox, F.E. (1991). Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunology today* 12, A17-21.
- Machado, P.R., Lessa, H., Lessa, M., Guimaraes, L.H., Bang, H., Ho, J.L., and Carvalho, E.M. (2007). Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 44, 788-793.
- Marsden, P.D. (1986). Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80, 859-876.
- Marsden, P.D., Tada, M.S., Barreto, A.C., and Cuba, C.C. (1984). Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78, 561-562.

- Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K., and Kuroki, Y. (2007). Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC genomics* 8, 124.
- McGettrick, A.F., and O'Neill, L.A. (2010). Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Current opinion in immunology* 22, 20-27.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 8, 452-456.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Mendes, D.S., Dantas, M.L., Gomes, J.M., dos Santos, W.L., Silva, A.Q., Guimaraes, L.H., Machado, P.R., de Carvalho, E.M., and Arruda, S. (2013). Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, CD31<sup>+</sup> and vW<sup>+</sup> cells in non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108, 18-22.
- Ministério da Saúde, (2009). Guia de vigilância Epidemiológica. 7<sup>a</sup> edição, Ed. Brasília.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde : relatório de situação : Bahia. (2011) 5<sup>a</sup> edição. Ed. Brasília. 35 p.
- Miranda, J.C., Reis, E., Schriefer, A., Goncalves, M., Reis, M.G., Carvalho, L., Fernandes, O., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2002). Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 185-188.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to

- profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* 136, 2348-2357.
- Mosser, D.M., and Brittingham, A. (1997). *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* 115 Suppl, S9-23.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* 8, 958-969.
- Mosser, D.M., and Rosenthal, L.A. (1993). *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Seminars in cell biology* 4, 315-322.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., and Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.
- Murray, H.W., Rubin, B.Y., and Rothermel, C.D. (1983). Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *The Journal of clinical investigation* 72, 1506-1510.
- Ogonda, L.A., Orago, A.S., Otieno, M.F., Adhiambo, C., Otieno, W., and Stoute, J.A. (2010). The levels of CD16/Fc gamma receptor IIIA on CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are higher in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia than in children with cerebral or uncomplicated malaria. *Infection and immunity* 78, 2173-2181.
- Oliveira, F., Bafica, A., Rosato, A.B., Favali, C.B., Costa, J.M., Cafe, V., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2011). Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 85, 70-73.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13766-13771.

- Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527-2534.
- Peters, N.C., Egen, J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M.P., Germain, R.N., and Sacks, D. (2008). *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970-974.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Raman, V.S., Bhatia, A., Picone, A., Whittle, J., Bailor, H.R., O'Donnell, J., Pattabhi, S., Guderian, J.A., Mohamath, R., Duthie, M.S., *et al.* (2010). Applying TLR synergy in immunotherapy: implications in cutaneous leishmaniasis. *Journal of immunology* 185, 1701-1710.
- Reed, S.G., Bertholet, S., Coler, R.N., and Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in immunology* 30, 23-32.
- Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R.P., Lessa, H., Bacellar, O., and Carvalho, E.M. (1998). Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 31, 143-148.
- Robbins, C.S., and Swirski, F.K. (2010). The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67, 2685-2693.
- Romero, G.A., Guerra, M.V., Paes, M.G., and Macedo, V.O. (2001). Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 65, 456-465.
- Sacks, D., and Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews Immunology* 2, 845-858.

- Saha, P., and Geissmann, F. (2011). Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunology and cell biology* 89, 2-4.
- Saitoh, S., and Miyake, K. (2009). Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors. *Immunological reviews* 227, 32-43.
- Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R., and Sher, A. (2002). Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *Journal of immunology* 168, 5997-6001.
- Scharon-Kersten, T., and Scott, P. (1995). The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *Journal of leukocyte biology* 57, 515-522.
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology* 26, 421-452.
- Shah, J.A., Darrah, P.A., Ambrozak, D.R., Turon, T.N., Mendez, S., Kirman, J., Wu, C.Y., Glaichenhaus, N., and Seder, R.A. (2003). Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice. *The Journal of experimental medicine* 198, 281-291.
- Singh, R.K., Srivastava, A., and Singh, N. (2012). Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiological research* 167, 445-451.
- Skinner, N.A., Maclsaac, C.M., Hamilton, J.A., and Visvanathan, K. (2005). Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clinical and experimental immunology* 141, 270-278.
- Skrzeczynska-Moncznik, J., Bzowska, M., Loseke, S., Grage-Griebenow, E., Zembala, M., and Pryjma, J. (2008). Peripheral blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. *Scandinavian journal of immunology* 67, 152-159.
- Smedman, C., Ernemar, T., Gudmundsdotter, L., Gille-Johnson, P., Somell, A., Nihlmark, K., Gardlund, B., Andersson, J., and Paulie, S. (2011). FluoroSpot

- analysis of TLR-activated monocytes reveals several distinct cytokine secreting subpopulations. *Scandinavian journal of immunology*.
- Soares, G., Barral, A., Costa, J.M., Barral-Netto, M., and Van Weyenbergh, J. (2006). CD16<sup>+</sup> monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased *ex vivo* levels and correlation with clinical data. *Journal of leukocyte biology* 79, 36-39.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual review of immunology* 21, 335-376.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-451.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., and Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of immunology* 173, 6521-6525.
- Whitaker, S.M., Colmenares, M., Pestana, K.G., and McMahon-Pratt, D. (2008). *Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4. *Infection and immunity* 76, 2149-2156.
- Wickelgren, I. (2006). Immunology. Mouse studies question importance of toll-like receptors to vaccines. *Science* 314, 1859-1860.
- Wong, K.L., Tai, J.J., Wong, W.C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.H., Kourilsky, P., and Wong, S.C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, e16-31.
- Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J., Ong, S.M., Dang, T.M., and Wong, S.C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic research* 53, 41-57.
- Yarovinsky, F., and Sher, A. (2006). Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* 36, 255-259.
- Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.R., Fliser, D., and Heine, G.H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118, e50-61.

- Zhang, W.W., and Matlashewski, G. (2008). Immunization with a Toll-like receptor 7 and/or 8 agonist vaccine adjuvant increases protective immunity against *Leishmania major* in BALB/c mice. *Infection and immunity* 76, 3777-3783.
- Ziegler-Heitbrock, H.W. (1996). Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> subpopulation. *Immunology today* 17, 424-428.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Strobel, M., Kieper, D., Fingerle, G., Schlunck, T., Petersmann, I., Ellwart, J., Blumenstein, M., and Haas, J.G. (1992). Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood* 79, 503-511.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of leukocyte biology* 81, 584-592.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., *et al.* (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-80.

## 12. ANEXOS

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

**Nome do Projeto:** Resposta Imune Protetora e Patológica na Infecção por *L.braziliensis*.

**Investigador Principal:** Edgar M. Carvalho, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

**Comitê de Ética:** Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/n - 1º andar, Canela **CEP:** 40.110-060 Salvador – Bahia- Telefone: (71) 3283-8043

**Nome do Paciente:** \_\_\_\_\_

**Número de Identificação no Projeto:**

**Convite e Objetivo:** Você é convidado (a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa ou se mantém infectadas com a *leishmania* sem apresentar doença. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado (a) assinar este formulário de consentimento.

**Participação Voluntária:** A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento caso você tenha a doença cutânea ou mucosa. Caso depois de aceitar participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose (Glucantime\_) se estiver doente.

**Finalidade do Estudo:** Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela *leishmania*. Para isto estudaremos o seu sangue, o parasito que causa a doença quando este for isolado, e caso esteja doente, também o material da ferida obtida pela retirada de um pequeno pedaço da sua pele.

**Procedimentos:** Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico, realizar biópsia da lesão caso apresente ferida na pele ou mucosa, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença. Você doará 30 a 50 ml de sangue (mais ou menos 2 colheres de sopa) para a pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo. A retirada do pedaço da pele ou da ferida do nariz para o diagnóstico da sua doença, caso necessário, será feita com anestesia para você não sentir dor e parte deste material será utilizado para os estudos da defesa do seu corpo contra a *leishmania*. Caso o diagnóstico de leishmaniose não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído.

**Duração do estudo:** Após a assinatura do termo de consentimento e avaliação diagnóstica sua participação no estudo acabará 1 dia. Caso se constate que você tem a doença leishmaniose, todo mês você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de nova série de Glucantime- ou de outra medicação, que também lhe será fornecido gratuitamente. Isto não faz parte do estudo.

**Confidencialidade:** Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe científica. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

**Análises de Riscos e Benefícios:** Caso esteja doente, o tratamento que você receberá (Glucantime) é semelhante ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. Não existe nenhum procedimento adicional para os participantes do estudo, assim não existe também nenhum risco adicional para você.

**Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:** As leishmanioses são doenças relacionadas à reação do seu organismo contra a *leishmania* e o conhecimento destas reações do seu corpo pode contribuir não só para o entendimento da doença como para o aparecimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose.

**Custos:** Você não terá custos com o tratamento com antimônio ou com outra droga para tratamento da leishmaniose caso haja necessidade de uso. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

**Esclarecimentos:** Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contatar um dos seguintes investigadores pelo telefone 71- 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho, Dr. Paulo Machado e Dr. Luiz Henrique Guimarães. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgar Santos, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone: (71) 3283-8140

**Consentimento:** Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

- Sim, eu concordo que a amostra de sangue e / ou pele possam ser guardadas para pesquisa no futuro.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue e / ou pele possam ser guardadas para pesquisa no futuro.

---

Assinatura do participante	Data	Hora
----------------------------	------	------

---

Assinatura da testemunha	Data	Hora
--------------------------	------	------

#### COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

---

Assinatura do pesquisador	Data	Hora
---------------------------	------	------

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE EM CONTROLES SADIOS

**Nome do Projeto:** Resposta Imune Protetora e Patológica na Infecção por *L.braziliensis*.

**Investigador Principal:** Edgar M. Carvalho, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

**Comitê de Ética:** Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/n - 1º andar, Canela **CEP:** 40.110-060 Salvador – Bahia- Telefone: (71) 3283-8043

NOME DO PARTICIPANTE: \_\_\_\_\_

### Número de Identificação no Projeto:

**Convite e Objetivo:** Você é convidado (a) a participar como voluntário de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo aos médicos que fazem parte do projeto. Antes de concordar em participar desta pesquisa é importante que você leia este documento, e caso decida participar do estudo você será solicitado (a) a assinar este formulário de consentimento.

**Participação Voluntária:** A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da doença Leishmaniose Tegumentar Americana. Você é livre para recusar a participar no estudo.

**Finalidade do Estudo:** Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela leishmania. Para isto estudaremos o seu sangue.

**Procedimentos:** Caso concorde em participar do estudo, você doará 30 a 50 ml de sangue (mais ou menos 2 colheres de sopa) para separação das células de defesa e pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo frente à infecção por leishmania.

**Confidencialidade:** Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe científica. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

**Análises de Riscos e Benefícios:** A retirada de sangue nos pacientes pode provocar dor leve devido à punção com agulha. Em casos raros se acompanhada de sangramento ou mancha na pele. A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados.

**Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:** O entendimento de como a resposta imune contribui para o desenvolvimento da leishmaniose tegumentar trará benefícios grandes aos portadores da doença, inclusive o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

**Custos:** Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

**Esclarecimentos:** Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contatar um dos seguintes investigadores pelo telefone 71- 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho, Dr. Paulo Machado e Dr. Luiz Henrique Guimarães. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone: (71) 3283-8140

**Consentimento:** Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

- Sim, eu concordo que a amostra de sangue possa ser guardada para pesquisa no futuro.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue possa ser guardada para pesquisa no futuro.

---

Assinatura do participante

Data

Hora

---

Assinatura da testemunha

Data

Hora

#### COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

---

Assinatura do pesquisador

Data

Hora