



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS DIFERENTES ISOLADOS DE
Leishmania braziliensis E DOS MONÓCITOS NA
PATOGENESE DA LEISHMANIOSE DISSEMINADA**

Andreza Santos Dórea

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dórea, Andreza Santos
AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS DIFERENTES ISOLADOS DE
Leishmania braziliensis E DOS MONÓCITOS NA
PATOGENESE DA LEISHMANIOSE DISSEMINADA/
Andreza Santos Dórea. - Salvador, 2019.
80 f.

Orientadora: Olívia Bacellar.
Dissertação (Mestrado)- Universidade
Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da
Bahia, 2019.

1. Isolados de *L.braziliensis*. 2. Leishmaniose
Disseminada. I. Bacellar, Olívia. II. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS DIFERENTES ISOLADOS DE *Leishmania
braziliensis* E DOS MONÓCITOS NA PATOGÊNESE DA
LEISHMANIOSE DISSEMINADA**

ANDREZA SANTOS DÓREA

Professora-orientadora: Maria Olívia Amado Ramos Bacellar

Dissertação apresentada ao colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em Imunologia e Doenças Infecciosas.

Salvador (Bahia), 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES:

Profa. Dra. Camila Indiani de Oliveira, Pesquisadora do Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA, professora permanente dos cursos de pós-graduação em Patologia (UFBA-FIOCRUZ), em Ciências da Saúde (UFBA) e professora adjunta da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências. Tem experiência em protozoologia parasitária humana e nas leishmanioses com ênfase na interação leishmania-hospedeiro-vetor. Atualmente é vice-diretora da FIOCRUZ-BA e coordenadora adjunta da câmara de ciências biológicas III da CAPES.

Profa. Dra. Natália Barbosa Carvalho, Bióloga do Instituto de Biologia da UFBA, tem experiência na linha de imunologia de doenças infecciosas, tendo atuado nas seguintes áreas: resposta imune inata e adquirida do hospedeiro contra a infecção pelas bactérias intracelulares *Mycobacterium spp* e *Brucella abortus*; imunopatogênese e manifestações clínicas das infecções pelo vírus HTLV-1 e por *Leishmania braziliensis*.

Profa. Dra. Maria Olivia Amado Ramos Bacellar, Pesquisadora do Serviço de Imunologia (SIM) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), do Tropical Medicine Research Center do NIH, EUA e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT). Professora permanente dos Programas de Pós Graduação em Imunologia (PPGI) e de Ciências da Saúde (PPGCS),UFBA. Tem experiência na área de imunoparasitologia, principalmente imunologia das leishmanioses além de estudos na resposta imune da esquistossomose e da infecção pelo HTLV-1.

MEMBRO SUPLENTE:

Prof. Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer, Professor Adjunto do departamento de Biointeração e dos Programas de Pós Graduação em Imunologia (PPGI) e de Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Tem experiência nas áreas de biologia molecular e imunologia, com ênfase no estudo de polimorfismo genético e estrutura populacional de agentes infecciosos, bem como resposta imune frente às infecções.

*“Tu és o meu Deus; graças te darei! Ó meu Deus, eu te exaltarei!
Dêem graças ao Senhor, porque ele é bom; o seu amor dura para sempre”.*
(Salmos 118:28,29).

DEDICATÓRIA

A Deus toda gratidão, dedico essa etapa de minha vida, confiando que continuarás a conduzir meus passos em direção a Tua Vontade perfeita e soberana.

Aos meus amados pais Adilson e Jaciara com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. E ao meu irmão Andrey pela admiração.

Ao meu marido Marcos Dórea que me acompanhou nessa trajetória com todo apoio e incentivo.

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Tropical Medicine Research Center (TMRC)
- **Bolsa de estudos:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a minha orientadora por todos os ensinamentos que foram muito além dos conteúdos do currículo. Tivemos aprendizados importantes para a vida. Muito obrigada pela sua dedicação, paciência e organização ao orientar.
- A Dr^o Paulo Machado, Chefe do Serviço de Imunologia.
- A Dr^o Edgar Carvalho por toda colaboração e auxílio.
- Aos médicos pesquisadores do Serviço de Imunologia que dá suporte clínico avaliando os pacientes de Corte de Pedra. Em especial a todos os funcionários da área endêmica de Corte de Pedra, em especial a Ednaldo Lago e Neuza Lago.
- Aos pacientes da área endêmica acometido pela leishmaniose, afinal toda essa dedicação visa a sua melhoria.
- A Pedro Paulo Carneiro por todo ensinamento, ajuda e apoio que foram muito importantes para mim. Com todo o carinho e de coração eu agradeço.
- A Rúbia Costa por acreditar em mim, pelo apoio, pela palavra sábia, sou muito grata.
- Aos amigos do laboratório de Imunoregulação: Jacilara Alexandrino, Walker Nonato, Jamile Lago, Anadilton da Hora, cada um de vocês provou ser um elemento valioso e indispensável nesta conquista alcançada.
- A Lilian Medina por toda ajuda a manusear nos isolados de *L.braziliensis* e pela amizade construída.
- Aos colegas e funcionários do Serviço de Imunologia.
- Vou levar cada pessoa no meu coração e serei para sempre eternamente grato.
- É claro que não posso esquecer da minha família e amigos, porque foram eles que me incentivaram e inspiraram através de gestos e palavras a superar todas as dificuldades.

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	3
ÍNDICE DE TABELA	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
I. RESUMO	7
II. OBJETIVOS	8
II. 1 OBJETIVO GERAL	8
II. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
III. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	9
IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
IV.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	13
IV.2 TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	15
IV.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	15
IV.4 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE DISSEMINADA	16
IV.5 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	17
IV.6 RESPOSTA IMUNE INATA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	19
IV.7 OS RECEPTORES DO TIPO TOLL NA INFECÇÃO POR <i>Leishmania braziliensis</i>	20
IV.8 MECANISMOS OXIDATIVOS ENVOLVIDOS NA MORTE DA LEISHMANIA	23
IV.9 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE DISSEMINADA	24
IV.10 POLIMORFISMO DE <i>Leishmania braziliensis</i> EM CORTE DE PEDRA-BAHIA	24
V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	26
V.1 ÁREA ENDÊMICA DE CORTE DE PEDRA-BA	26
V.2 DESENHO DO ESTUDO	27
V.3 DEFINIÇÃO DOS CASOS	27
V.3.1 Leishmaniose Disseminada (LD)	27
V.3.2 Leishmaniose Cutânea (LC)	27
V.3.3 Controles Sadios (CS)	28
V.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	28
V.5 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO	28
V.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	28
V.7 METODOLOGIA	29
V.7.1 Fluxograma Representativo	29
V.7.2 Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)	30
V.7.3 Infecção dos monócitos com diferentes isolados de <i>Leishmania braziliensis</i>	30
V.7.4 Avaliação do grau de infecção e do número de parasitos intracelulares	31
V.7.5 Viabilidade de promastigotas	31
V.7.6 Avaliação do <i>burst</i> oxidativo em monócitos de pacientes LD e LC após infecção com <i>L. braziliensis</i>	32
V.7.7 Avaliação da expressão de TLR2 e TLR4	32
V.7.8 Avaliação intracelular de citocinas e quimiocinas	33
V.7.9 Análises estatísticas	34

VI.RESULTADOS	35
VI.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	35
VI.2 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO E DA CARGA PARASITÁRIA EM MONÓCITOS DE PACIENTES LD E LC APÓS A INFECÇÃO COM OS DIFERENTES ISOLADOS DE <i>L. braziliensis</i>	36
VI.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS DIFERENTES ISOLADOS DE <i>L. braziliensis</i> NOS MONÓCITOS DE PACIENTES COM LD E LC	39
VI.4 AVALIAÇÃO DO <i>BURST</i> OXIDATIVO POR MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE DISSEMINADA E PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA APÓS INFECÇÃO POR DIFERENTES ISOLADOS <i>L. braziliensis</i>	41
VI.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO <i>ex vivo</i> DE TLR2 E TLR4 NOS MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE DISSEMINADA E LEISHMANIOSE CUTÂNEA.	43
VI.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TLR2 E TLR4 APÓS A INFECÇÃO DE MONÓCITOS COM OS DIFERENTES ISOLADOS DE <i>Leishmania braziliensis</i> .	45
VI.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DAS CITOCINAS EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE DISSEMINADA E LEISHMANIOSE CUTÂNEA.	47
VI.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DAS QUIMIOCINAS CXCL9 E CXCL10 EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE DISSEMINADA E LEISHMANIOSE CUTÂNEA.	49
VII. DISCUSSÃO	51
VIII. SUMÁRIO DE RESULTADOS	61
IX. CONCLUSÃO	62
X. SUMMARY	63
XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
XII. ANEXOS	73
ANEXO I: FIGURA REPRESENTATIVA DA SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DE MONÓCITOS	73
ANEXO II: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA DISSEMINADA	74
ANEXO III: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE EM CONTROLES SADIOS	77
ANEXO IV: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CD14	Grupo de Diferenciação 14
CD16	Grupo de Diferenciação 16
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
DHR	Dihidrorodamina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FITC	Isocianato de fluoresceína
IDR	Intradermo reação de Montenegro
IFN- γ	Interferon-gamma
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PE	Ficoeritrina
PMA	Phorbol Miristato Acetado, do inglês <i>Phorbol myristate acetate</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa, do inglês <i>Real Time Quantitative</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
Th1	Linfócitos T “helper” auxiliar tipo 1
Th2	Linfócitos T “helper” auxiliar tipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	Receptor do Tipo Toll, do inglês <i>Toll-like Receptors</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LD	Leishmaniose Disseminada

LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LV	Leishmaniose Visceral
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso, do inglês <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
SC	Subclínico
SLA	Antígeno Solúvel de Leishmania, do inglês soluble <i>Leishmania antigen</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógeno
iNOS	Óxido Nítrico sintetase

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1- Aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes com leishmaniose disseminada e leishmaniose cutânea.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Localização da região de Corte de Pedra-BA.

Figura 2- Centro de referência em Leishmaniose Dr. Jackson M.L. Costa-Corte de Pedra-BA.

Figura 3- Avaliação da infecção e da carga parasitária em monócitos de pacientes LD e LC após a infecção com os diferentes isolados de *L. braziliensis*.

Figura 4- Viabilidade das promastigotas extracelulares nos monócitos de pacientes com LD e LC após infecção dos diferentes isolados de *L. braziliensis*.

Figura 5- Expressão do *burst* oxidativo por monócitos de pacientes com leishmaniose disseminada e monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea.

Figura 6- Expressão *ex vivo* de TLR2 e TLR4 nos monócitos de pacientes com LD e LC.

Figura 7- Expressão de TLR2 e TLR4 nos monócitos de pacientes com LD e LC após a infecção dos diferentes isolados de *L. braziliensis*.

Figura 8- Produção intracelular de TNF e IL-10 em monócitos de pacientes com LD e LC infectados com os diferentes isolados de *L. braziliensis*.

Figura 9- Avaliação da produção intracelular das quimiocinas CXCL9 e CXCL10.

Figura 10- Figura representativa da seleção da população de monócitos.

I. RESUMO

Introdução: A Leishmaniose Disseminada (LD) causada por *Leishmania braziliensis*, é caracterizada pela presença de 10 ou mais lesões papulares, acneiformes e ulceradas. Alguns estudos têm mostrado que *L.braziliensis* isoladas de pacientes com LD, leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) são polimórficas, apresentando uma diversidade genética que está associada com as formas clínicas na leishmaniose tegumentar americana (LTA). O antígeno solúvel obtido de isolados de *L.braziliensis* de pacientes LD induz uma resposta inflamatória maior quando comparado com antígeno obtido de isolados de pacientes com LC em células de pacientes com LC e LD. Estudos têm mostrado que monócitos/macrófagos de pacientes com LC e LM comportam-se de maneira diferente frente à infecção com *L.braziliensis* quando comparado com células de controles sadios (CS). Ainda não existem estudos sobre o comportamento dos monócitos na LD. **Objetivo:** Avaliar o papel de monócitos e de isolados de *Leishmania braziliensis* genotipicamente diferentes na resposta inflamatória observada na leishmaniose disseminada. **Métodos:** Monócitos de pacientes com LD (n=12), LC (n=12) e de CS (n=5) foram infectados com isolados de *L. braziliensis* de pacientes com LD e isolados de pacientes com LC na proporção de 5:1. A avaliação do grau de infecção e da carga parasitária foi avaliada através da contagem de preparações de *cytospin* por microscopia óptica. Para a análise da sobrevivência dos diferentes isolados de *L. braziliensis* em monócitos de pacientes com LC,LD e CS foi realizada a contagem de promastigotas viáveis no sobrenadante de culturas utilizando a técnica de microscopia óptica. A avaliação da produção dos radicais oxidativos foi realizada pela oxidação da Dihidrorodamina 123 (DHR-123) e analisada através da citometria de fluxo. A expressão de TLRs e de citocinas/quimiocinas foi avaliada através de citometria de fluxo. **Resultados:** A frequência de monócitos de pacientes com LD infectados com isolado de LD e a carga parasitária foi maior do que a observada em monócitos infectados com o isolado LC após 48 horas de infecção. O mesmo foi observado nas células de pacientes com LC. O número de promastigotas viáveis no sobrenadante de monócitos infectado com o isolado LD foi maior quando comparado com o isolado LC em ambos os grupos. O mesmo foi observado em monócitos de CS. A produção de burst oxidativo pelos monócitos de LD, LC e CS infectados com isolado LD foi maior quando comparada a isolado de LC. A expressão de TLR2 foi maior em monócitos LD após infecção com isolado LD quando comparado com isolado LC. A produção de CXCL9 em monócitos de LD foi maior após a infecção com o isolado de LD quando comparado com o isolado LC. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que as diferenças genóticas da *L.braziliensis* que causa LD e LC podem influenciar o comportamento desse parasito nos monócitos humanos e contribuir para a patogênese da doença.

Palavras chaves: Isolados de *L. braziliensis*; Leishmaniose Disseminada.

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel de monócitos e dos isolados de *Leishmania braziliensis* genotipicamente diferentes na resposta inflamatória observada na leishmaniose disseminada.

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o grau de infecção e a carga parasitária em monócitos de pacientes com Leishmaniose Disseminada (LD) e Leishmaniose Cutânea (LC) após infecção com *L. braziliensis* isoladas de pacientes com LC e LD.
2. Determinar a capacidade de *L. braziliensis* isoladas de pacientes LC e LD em sobreviver em monócitos de pacientes com LC e LD.
3. Avaliar a produção do *burst* oxidativo em monócitos de pacientes com LD e pacientes com LC infectados com *L. braziliensis* isoladas de pacientes com LC e LD.
4. Avaliar a expressão de *Toll Like Receptor 2* (TLR2) e *Toll Like Receptor 4* (TLR4) em monócitos de pacientes com LD e LC infectados com diferentes isolados de *L. braziliensis*.
5. Avaliar a produção intracelular de moléculas inflamatórias e regulatória (TNF, CXCL9, CXCL10 e IL-10) em monócitos de pacientes com LD e LC infectados com diferentes isolados de *L. braziliensis*.

III. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma doença infecciosa não contagiosa, causada por diferentes espécies de parasitas protozoários, que é transmitida por picadas de flebotomíneos. Classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma Doença Tropical Negligenciada (WHO, 2017), a leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* cujas principais formas clínicas são a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar americana (LTA). Diversas espécies do parasito foram identificadas como agente etiológico da doença em humanos, as quais inicialmente foram classificadas com base nas manifestações clínicas, fatores epidemiológicos e geográficos (Grimaldi *et al.*, 1993). As leishmanioses apresentam ampla distribuição geográfica e são endêmicas em diversos países. Em 2015, entre 200 países ou territórios reportados à OMS, 44% foram endêmicos para LT e 38% para LV (WHO, 2017). A região das Américas ocupa o segundo lugar entre as seis regiões que registram a proporção mais alta de países acometidos pela LT (WHO, 2017), e o Brasil contribui com esse alto registro de casos. Está entre os doze países que totalizam 90% dos casos de LT mundiais (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2017) e tem a *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* como principais espécies causadoras de LT (Grimaldi *et al.*, 1993).

As formas clínicas da doença estão relacionadas com a espécie de *Leishmania sp.* infectante, fatores ambientais e resposta imune do hospedeiro (Marsden P.D.,1985).

Na Bahia, a região de Corte de Pedra, localizada a 280 km da capital Salvador, corresponde a uma área endêmica para transmissão de *L.*

braziliensis. Em 20 anos, foram atendidos 12.424 indivíduos com LT no posto de saúde que é referência para tratamento da doença naquela área (Jirmanus *et al.*, 2012), e só no ano de 2017 foram atendidos 1.384 casos novos no mesmo local.

Em Corte de Pedra, a infecção por *L. braziliensis* apresenta amplo espectro de manifestações clínicas: leishmaniose cutânea (LC), caracterizada por lesão ulcerada na pele (Marsden, 1985; Gontijo *et al.*, 2003); leishmaniose mucosa (LM), que envolve o comprometimento das mucosas (CUBA *et al.*, 1985; Lessa *et al.*, 2007), e a leishmaniose disseminada (LD), forma na qual o paciente apresenta inúmeras lesões papulares e acneiformes distribuídas pelo corpo (Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2011). Dentre essas formas, a LC é a mais prevalente na região e caracteriza-se por uma resposta inflamatória não adequadamente modulada, com alta produção de TNF e IFN- γ (Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998; Bacellar *et al.*, 2002), que são essenciais na eliminação do parasito mas contribuem com o dano tecidual (Antonelli *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011).

A forma emergente da doença, a LD, se diferencia das outras formas por suas peculiaridades clínicas e imunológicas. Em alguns estudos prévios os casos de Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) eram confundidos com a LD por sua semelhança clínica. Os estudos realizados com LD ajudaram a discriminar estas duas formas clínicas (Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002). A leishmaniose disseminada, causada principalmente por *L. braziliensis* (Carvalho *et al.*, 1994) é mais comumente observada no nordeste brasileiro, mais especificamente na área endêmica de Corte de Pedra, na Bahia, local onde se observa quase todos os casos de leishmaniose disseminada do país

(Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002), havendo apenas alguns relatos de casos isolados em outros estados (Galvão *et al.*, 1993; Vieira-Gonçalves *et al.*, 2008). Nessa forma da doença os pacientes podem apresentar de 10 a mais de 1.000 lesões (papulares, acneiformes e ulceradas) distribuídas em duas ou mais partes do corpo e com uma alta frequência de envolvimento da mucosa (Turetz *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2011).

A prevalência de LD aumentou de 0,2 a 4% nos últimos 30 anos na área endêmica de Corte de Pedra, uma área endêmica de transmissão de *L. braziliensis* (Jirmanus *et al.*, 2012).

Os pacientes com LD apresentam sintomas gerais como febre, calafrios, fraqueza e mal-estar na primeira semana do aparecimento da lesão, sintomas esses que não são observados em nenhuma outra forma de LTA. Embora os mecanismos relacionados à disseminação da doença não sejam conhecidos, a disseminação rápida e a ocorrência de sintomas sistêmicos sugere uma disseminação hematogênica (Carvalho *et al.*, 1994). Os linfócitos T de pacientes com LD produzem IFN- γ após exposição ao antígeno solúvel de leishmania (SLA) (Carvalho *et al.*, 1994). Adicionalmente, já foi demonstrado que células de pacientes com LD estimuladas com o SLA *in vitro* produzem menos IFN- γ e TNF quando comparado com a produção observada em pacientes com LC (Turetz *et al.*, 2002 ; Machado *et al.*, 2011).

Alguns estudos têm mostrado evidências de polimorfismo de leishmanias e cepas de *L.(V) braziliensis* isoladas de pacientes com LC, LD e LM, genotipadas por protocolos RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) apresentaram uma diversidade genética e esse polimorfismo foi associado com as formas clínicas na LTA (Schriefer *et al.*, 2004; Queiroz *et al.*, 2012). A

semelhança entre os achados imunopatológicos em pacientes com LD e LC sugere que não existe redução de resposta do tipo Th1 nos pacientes com LD. Foi demonstrado que, antígeno solúvel obtido de isolados de *L.braziliensis* de pacientes com LD induz uma resposta inflamatória maior quando comparado com antígeno obtido de isolados de pacientes com LC em células de pacientes com LC e LD (Leopoldo *et al.*, 2006). Esses resultados sugerem que o parasito pode participar na patogênese da doença.

Estudos realizados com células da resposta imune inata mostraram que pacientes com LC apresentam uma frequência maior de monócitos inflamatórios, produtores de TNF e IL-1 β (Soares *et al.*, 2006; Passos *et al.*, 2015; Novais *et al.*, 2017). Adicionalmente, os monócitos de pacientes com LC produzem mais *burst* oxidativo após a infecção com *L.braziliensis* e enquanto a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi associada à morte do parasito, a produção de óxido nítrico (NO) foi associada com o desenvolvimento da lesão (Carneiro *et al.*, 2016). Monócitos de pacientes com LC expressam *ex vivo* mais TLR2 e TLR4 quando comparado com células de indivíduos saudáveis. E a infecção com *L. braziliensis* aumentou a expressão desses receptores. (Carneiro *et al.*, 2016). Ainda não existem estudos sobre o comportamento dos monócitos na LD. Dessa forma é relevante avaliar o papel dessas células e dos diferentes isolados de *L.braziliensis* na patogênese da doença.

IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

IV.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

AMERICANA

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por várias espécies do gênero *Leishmania* e se apresenta como um importante problema de saúde pública devido a sua ampla distribuição geográfica e ao alto número de casos. É endêmica em 98 países e está presente principalmente no Hemisfério Oriental: na África, Ásia, e Sul da Europa. (Alvar *et al.*, 2012) No Novo Mundo, é endêmica no Hemisfério Ocidental. Não são documentados casos de leishmaniose na Oceania, Antártida e ilhas do Oceano Pacífico. O aumento do fluxo migratório nos últimos anos favoreceu uma maior distribuição da doença no mundo. São 1,6 milhões de novos casos da doença por ano, sendo 1,2 milhões de casos da forma tegumentar e 400 mil da leishmaniose visceral. (Alvar *et al.*, 2012). Em 2015, Brasil, Colômbia e Peru foram responsáveis por 16% dos 197.552 novos casos mundiais de LT computados naquele ano, demonstrando a alta contribuição das Américas na quantidade de casos de leishmaniose tegumentar no mundo (WHO, 2017).

A LT é a forma mais comum da doença e o Brasil contribui com o alto número de casos dessa forma clínica registrados na região das Américas. Além disso, o Brasil está entre os doze países que juntos somam 90% dos casos mundiais de LT (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2017). As principais espécies causadoras de leishmaniose tegumentar no país são *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* (Grimaldi *et al.*, 1993; revisado por Reithinger *et al.*, 2007).

No ano de 2014 foram notificados 20.296 casos de LT no Brasil, destes, cerca de 51% correspondem à região norte que ocupa o primeiro lugar entre as regiões do país com mais notificações de LT, seguida da região nordeste que apresentou 4.969 casos no referido ano (Brasil, 2016). Entre os estados da região nordeste, a Bahia foi o segundo com maior índice de LT apresentando 1.998 casos, (Brasil, 2016).

Na Bahia, a região de Corte de Pedra, localizada a 280 km da capital Salvador, é uma área endêmica de transmissão de *L. braziliensis* que contribui significativamente com o número de casos registrados no estado. Em um período de 20 anos, 12.424 indivíduos com lesões características de leishmaniose tegumentar foram atendidos no posto de saúde referência para o tratamento da doença nesta região (Jirmanus *et al.*, 2012). Nesse mesmo local foram atendidos 1.384 casos de LT em 2017.

A leishmaniose visceral não ocorre nesta região, entretanto além da *L. braziliensis*, *L. amazonensis* foi identificada na vila de Corte de Pedra. Contudo, apenas *L. braziliensis* tem sido isolado nos últimos 15 anos. (Jirmanus *et al.*, 2012). Formas clínicas da infecção por *L. braziliensis* incluem leishmaniose cutânea localizada (LC), caracterizada por lesão ulcerada na pele (Marsden P.D. 1985; Gontijo *et al.*, 2003), leishmaniose mucosa (LM), uma forma grave que acomete a região nasofaríngea (Cuba *et al.*, 1985; Lessa *et al.*, 2007), e leishmaniose disseminada (LD), forma na qual o paciente apresenta inúmeras lesões papulares e acneiformes distribuídas pelo corpo (Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2011).

IV.2 TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A transmissão da leishmaniose ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor fêmea hematófago do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. A *Leishmania spp.* se multiplica no trato digestivo do vetor e os parasitas são transmitidos para o hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo do flebotomo vetor. No interior dos vetores, os parasitas do gênero *Leishmania* encontram-se na forma promastigota, entretanto após a inoculação na derme do hospedeiro vertebrado, estes parasitas são internalizados pelos fagócitos e transformam-se em amastigotas, que são capazes de sobreviver dentro dos vacúolos parasitóforos dessas células. Neste ambiente, as formas amastigotas multiplicam-se por divisão binária, resistindo aos mecanismos microbicidas dos fagócitos, principalmente macrófagos. Eventualmente, as células infectadas se rompem, liberando as amastigotas que podem infectar novas células. Durante um novo repasto sanguíneo, o flebotomo ingere células infectadas e, uma vez no interior do trato digestivo do vetor, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas (Rittig e Bogdan, 2000).

IV.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Na LTA, a infecção por *Leishmania braziliensis* pode provocar diferentes manifestações clínicas, como mencionado anteriormente. A forma cutânea (LC) é caracterizada por uma lesão ulcerada com fundo granulomatoso e bordas elevadas, distribuídas nas áreas do corpo expostas à picada do flebotomíneo, geralmente pernas e braços, e sem evidência de envolvimento da mucosa (Marsden P.D. 1985; Gontijo *et al.*, 2003). A úlcera classicamente vista no

paciente com LC ocorre 30-60 dias após o aparecimento da lesão inicial, período em que a LC é denominada tardia. Menos de 30 dias após a infecção, é possível identificar uma lesão papular não ulcerada, frequentemente acompanhada de linfadenopatia, sinais que caracterizam a LC recente (Machado *et al.*, 2002; Unger *et al.*, 2009). Além dos sinais e sintomas serem importantes no diagnóstico da LC, a doença é confirmada pela positividade da Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa (qPCR) das amostras das biópsias das lesões (Weirather *et al.*, 2011), detecção do parasito na cultura do aspirado da lesão e histopatologia compatível com a doença.

Cerca de 3% dos pacientes com LC desenvolvem a forma mucosa da doença no momento da ulceração cutânea ou vários meses depois (Jones *et al.*, 1987). A LM é gravemente desfigurante e é caracterizada por uma forte resposta imune contra o parasito, gerando lesões destrutivas das cavidades orofaríngeas e nasofaringe (Bacellar *et al.*, 2002; Lessa *et al.*, 2012). Além dessas formas, a leishmaniose disseminada foi notificada como uma forma emergente na área endêmica de Corte de Pedra e caracteriza-se por inúmeras lesões predominantemente papulares e acneiformes espalhadas por todo o corpo do indivíduo acometido (Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2011).

IV.4 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE DISSEMINADA

A LD é principalmente observada no nordeste brasileiro, mais especificamente na área endêmica de Corte de Pedra, na Bahia, local onde se observa quase todos os casos de LD do país (Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002), havendo apenas alguns relatos de casos isolados em outros estados (Galvão *et al.*, 1993; Vieira-Gonçalves *et al.*, 2008). Embora a

L. amazonensis e a *L. braziliensis* no passado tenham sido reportadas associadas com a LD (Carvalho *et al.*,1994) atualmente, somente a *L. braziliensis* tem sido associada com essa doença (Turetz *et al.*, 2002). Ao mesmo tempo, alguns genótipos de *L. braziliensis* foram mais associados com LD em uma área endêmica de LTA (Schriefer *et al.*, 2009; Queiroz *et al.*,2012). Na LD, os pacientes podem apresentar de 10 a mais de 1.000 lesões (papulares, acneiformes e ulceradas) distribuídas em duas ou mais partes do corpo e com uma alta frequência de envolvimento da mucosa (Turetz *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2011). Os pacientes com leishmaniose disseminada apresentam sintomas gerais como febre, calafrios, fraqueza e mal-estar na primeira semana do aparecimento da lesão, sintomas esses que não são observados em nenhuma outra forma de LTA. (Carvalho *et al.*,1994). Embora os mecanismos relacionados ao aparecimento súbito de múltiplas lesões não sejam conhecidos, inicialmente, com a ocorrência de sintomas sistêmicos, acreditava-se que ocorresse uma disseminação hematogênica (Carvalho *et al.*,1994).

IV.5 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Como a *Leishmania* é um organismo intracelular obrigatório, o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra este parasito é através da produção de IFN- γ , necessário para a ativação de macrófagos e síntese de derivados de O₂ a exemplo do óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Scott *et al.*,1988).

Muitos estudos têm contribuído com a compreensão da imunopatogênese da LC embora alguns aspectos ainda precisem ser

esclarecidos. Modelos experimentais de infecção por *L. major* foram os mais utilizados inicialmente, e demonstraram a dicotomia da resposta imunológica Th1xTh2. O perfil genético de susceptibilidade à infecção por *L. major* em camundongos BALB/C está relacionado com uma resposta do tipo Th2 mediada pela produção de IL-4 que contribui com o estabelecimento da doença e progressão das lesões. Contrariamente, o perfil de resistência nos camundongos C57BL/6 associa-se à resposta do tipo Th1 através da produção de IL-12 e IFN- γ que promove o controle da proliferação dos parasitos e a cura espontânea das lesões (revisado em Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Na LC em humanos, a resposta predominante do tipo Th1, que é essencial para a eliminação do patógeno, está associada com o desenvolvimento da doença. Pacientes com LC desenvolvem uma resposta inflamatória caracterizada pela alta produção de IFN- γ e TNF (Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998; Bacellar *et al.*, 2002; Antonelli *et al.*, 2005), citocinas importantes na ativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos para a eliminação dos parasitos fagocitados. No entanto, apesar de contribuírem com o controle da proliferação do parasito, os índices de IFN- γ e TNF estão diretamente relacionados com o tamanho da lesão e conseqüentemente, com o dano tecidual característico da leishmaniose cutânea (Antonelli *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011). Além dessas citocinas, pacientes com LC também apresentam baixa produção de IL-5 e IL-10, sendo esta última, importante na regulação da resposta Th1 (Bacellar *et al.*, 2002).

IV.6 RESPOSTA IMUNE INATA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Após a infecção por *Leishmania*, diferentes tipos de células da imunidade inata interagem com o parasita. Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras da *Leishmania*, estudos utilizando modelos animais têm demonstrado que neutrófilos e células dendríticas são também capazes de fagocitar o parasito na fase inicial da infecção (Pearson *et al.*, 1981). Os monócitos são células da linhagem mielomonocítica, que circulam na corrente sanguínea com uma meia-vida de 1-3 dias. Estas células são de grande importância na resposta imune, desde quando elas migram para o sítio da inflamação se diferenciando em macrófagos, principais células responsáveis pela eliminação de patógenos intracelulares (Moser B. and Willimann, K. 2004; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2000). Os monócitos podem ser classificados como clássicos (CD14^{high}CD16⁻) cerca de 90%, e os 10% são subdivididos em intermediários (CD14^{high}CD16⁺) e não clássicos (CD14^{low}CD16⁺⁺), sendo os intermediários encontrados em menor porcentagem (Ziegler-Heitbrock *et al.* 2010).

Os macrófagos podem responder a infecção com a *Leishmania* com a produção de citocinas e quimiocinas que favorecem o recrutamento e ativação de outras células. Nos últimos anos já tem sido demonstrado que monócitos/macrófagos participam da forte resposta inflamatória responsável pelo desenvolvimento da úlcera. Macrófagos de pacientes com LC e LM infectados *in vitro* com *L. braziliensis* produzem mais CCL2, CXCL9 e TNF quando comparado com células de indivíduos com infecção subclínica (SC) e controles saudáveis (Giudice *et al.*, 2012). A produção de TNF é necessária para a eliminação do parasito, mas também favorece o dano tecidual na LC. Na LC

existe uma predominância de monócitos inflamatórios, produtores das citocinas TNF e de IL-1 β (Santos *et al.*,2018; Novais *et al.*,2017; Passos *et al.*, 2015) Os monócitos/macrófagos também produzem mediadores que participam na resposta contra a infecção, sendo as principais fontes de CXCL10 e CCL3 em células mononucleares de controles sadios após infecção com *L. braziliensis* (Vargas-Inchaustegui *et al.*, 2010). CXCL10 é quimioatraente para células T, monócitos, macrófagos, células NK e dendríticas, enquanto CCL3 promove a atração de monócitos.

IV.7 OS RECEPTORES DO TIPO TOLL NA INFECÇÃO por *Leishmania braziliensis*

Os Toll foram descobertos pelo grupo da pesquisadora Cristiane Nusslein-Volhard em 1985, onde o gene codificador do Toll foi detectado no dorso ventral nos embriões da *Drosophila* (Anderson *et al.*, 1985). Nos anos seguintes, foi estabelecido que os TLRs reconheciam fragmentos de diferentes patógenos, resultando na ativação de vias regulatórias do sistema imune (Lemaitre *et al.*, 1996).

Em 1997, Medzhitov e colaboradores caracterizaram as proteínas humanas (análogas à proteína *toll* das drosófilas) presentes nas células do sistema imune inato que, ao serem ativadas por padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs), provocavam a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B e a transcrição de diferentes genes de citocinas pró-inflamatórias. Foram chamadas então de receptores do tipo TLRs (Medzhitov and Janeway, 1997).

Os TLRs são glicoproteínas transmembrana do tipo I que desempenham

um papel fundamental na resposta imune contra patógenos. 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 (Gurung and Kanneganti, 2015). A capacidade das espécies de *Leishmania*, nos momentos iniciais da infecção, de invadir e sobreviver dentro das células do hospedeiro envolve a interação de moléculas presentes na superfície do parasito com receptores nos macrófagos (Dos-Santos *et al.*, 2016). Vários estudos tem demonstrado que diferentes receptores medeiam a fagocitose de *Leishmania sp.* pelos macrófagos (Ueno and Wilson, 2012). Recentemente, o papel dos TLRs no reconhecimento de protozoários tem sido descrito como importante na produção de citocinas e na geração de uma resposta inflamatória eficaz (Gurung and Kanneganti, 2015).

As diferentes espécies de *Leishmania* expressam inúmeros PAMPs, (Lipofosfoglicano, Cytosine-phosphate-guanosine/CqG, Proteoglyco-lipid complex), que ativam principalmente os TLRs 2, 3, 4 e 9 (Becker *et al.*, 2003; Ives *et al.*, 2011; Kropf *et al.*, 2004a; Whitaker *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2006). Entretanto, a maioria dos estudos tem focado na interação da *Leishmania* com TLR2 e TLR4 (Faria *et al.*, 2012).

Em modelo experimental de infecção com *L. amazonensis*, em camundongos C57BL/6 deficientes para TLR2, foi observado diminuição da carga parasitária e no recrutamento de células inflamatórias no local da infecção (na orelha dos camundongos), sugerindo que este receptor participa da penetração do parasito e na formação do ambiente inflamatório (Guerra *et*

al., 2010). Os resultados encontrados nos estudos envolvendo o TLR4 foram controversos. Alguns estudos indicam que o TLR4 contribui significativamente no controle do crescimento de *Leishmania sp.* Em 2004, Kropf *et al.*, (Kropf *et al.*, 2004a) demonstraram que camundongos C57BL/10ScN 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 camundongos deficientes para TLR4 (C57BL/10ScN) não aumentavam o número de lesões (Antoniazzi *et al.*, 2004). Adicionalmente, camundongos (C57BL/10ScN) deficientes de TLR4 infectados com *L. major*, apresentam um aumento na síntese de IL -10 e da expressão do receptor de IL-4 (Kropf *et al.*, 2004b). Na infecção por *L. donovani*, em camundongos C57BL/6, modelo de susceptibilidade, mas auto curável, animal deficiente de TLR4 apresentou expressão diminuída de IFN- γ , TNF, óxido nítrico sintetase (iNOS) e baixa resposta a quimioterapia, indicando um papel protetor de TLR4 na infecção por *L. donovani* (Murray *et al.*, 2013). Entretanto, em humanos, um estudo avaliando a expressão de TLR2, TLR4 no baço e no sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral (LV) mostrou que enquanto no baço foi observado um aumento na expressão de TLR2 e TLR4 antes do tratamento quando comparado no mesmo tecido após o tratamento, nenhuma expressão foi documentada em células do sangue periférico, sugerindo um papel mais localizado desses receptores na LV humana (Kumar *et al.*, 2014).

Nosso grupo já tinha documentado que a expressão *ex vivo* de TLR2 e TLR4 foi maior em monócitos de pacientes com LC quando comparado com células de controles sadios e que a infecção com *L. braziliensis* aumentava

a expressão desses receptores (Carneiro *et al.*, 2016). Esses resultados indicam que a expressão desses receptores podem também contribuir com a patogênese da doença.

IV.8 MECANISMOS OXIDATIVOS ENVOLVIDOS NA MORTE DA LEISHMANIA

Ainda não foi possível esclarecer os mecanismos que permitem a persistência da *Leishmania sp.* no organismo e em alguns casos levam à disseminação da doença, mesmo com uma forte resposta adaptativa contra antígenos do parasito. Sobre esse aspecto, tem sido discutida a ideia de que a resistência da *Leishmania* no hospedeiro poderia estar relacionada a uma incapacidade dos macrófagos desses pacientes em produzir espécies reativas necessárias para a eliminação do parasito (Buchmuller, Mauel, 1981; Murray *et al.*, 1983). A produção do *burst* oxidativo, representado pela produção do anion superóxido (ROS) e pelo óxido nítrico (NO) por monócitos, é importante no controle da infecção por leishmania (Channon JY *et al.*, 1984). Entretanto, em humanos a expressão de iNOS na LC causada por *L. mexicana* está associada com o número de lesões (Qadoumi *et al.*, 2002). Recentemente, um estudo *in vitro* com pacientes com LC mostrou que a infecção de monócitos com *L. braziliensis* induz uma grande produção de *burst* oxidativo quando comparado com a produção por monócitos de indivíduos sadios. Entretanto, enquanto a produção de ROS foi relacionada com a morte do parasito, a produção de NO foi associada com o tamanho da lesão (Carneiro *et al.*, 2016). Esses estudos sugerem que uma alta produção do *burst* oxidativo pode estar associada à inflamação e à patogênese da doença.

IV.9 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE DISSEMINADA

A resposta imune na LD ainda não está muito bem esclarecida. Alguns dos poucos estudos realizados apontam que estes pacientes apresentam uma resposta imune celular ao antígeno de leishmania *in vitro* com uma produção de IFN- γ e de TNF significativamente menor que a produção observada em pacientes com LC (Turetz *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2011). Em adição, a avaliação *in situ* de citocinas demonstrou não haver diferença estatisticamente relevante na produção de TGF- β , CCL2, CCL3, CCL11 e CXCL10 entre os pacientes com LC e LD. Entretanto, a produção sistêmica de CXCL9, uma quimiocina relacionada com o recrutamento e ativação das células T, foi maior em pacientes com LD quando comparado com a produção observada em pacientes com LC.

IV.10 POLIMORFISMO DE *Leishmania braziliensis* EM CORTE DE PEDRA-BAHIA

As formas cutânea e mucosa da LTA estão associadas a diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, presente em muitas regiões da América Central e do Sul (Basano & Camargo, 2004). *L. braziliensis* exibe polimorfismos genéticos intraespecíficos (Cupolillo *et al.*, 1995) e várias manifestações clínicas, variando de lesões cutâneas simples (que podem cicatrizar espontaneamente) a lesões mucosas (Grimaldi e Tesh, 1993; Queiroz *et al.*, 2012).

Na área endêmica de Corte de Pedra-Bahia, estudos demonstraram evidências de polimorfismo de *L.(V) braziliensis* isoladas de pacientes com LC, LD e LM. Schriefer *et al.* (2004) encontraram uma estrutura populacional

multiclinal entre os isolados que foram obtidos de casos clínicos em Corte de Pedra, definidos por *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Diferentes perfis eletroforéticos foram observados nesses isolados de *L. braziliensis* que foram associados às formas clínicas LC, LM e LD. Um estudo posterior documentou que alguns genótipos de *L. braziliensis* estavam associados especificamente ao risco de desenvolver a LD (Queiroz *et al.*, 2012).

A semelhança entre os achados imunopatológicos em pacientes com LD e LC sugere que não existe redução de resposta do tipo Th1 nos pacientes LD. O antígeno solúvel obtido de isolados de *L. braziliensis* de pacientes com LD induz uma resposta inflamatória maior quando comparado com antígeno obtido de isolados de pacientes com LC em células de pacientes com LC e LD (Leopoldo *et al.*, 2006). Esses resultados sugerem que diferenças genéticas do parasito podem estar contribuindo na resposta inflamatória desses pacientes.

V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

V.1 ÁREA ENDÊMICA DE CORTE DE PEDRA-BA

A vila de Corte de Pedra pertence ao município de Presidente Tancredo Neves, que está localizado no Sudeste do estado da Bahia, a 280 km de Salvador, capital da Bahia. Nesta área está localizado o posto de saúde que atende uma população de aproximadamente 20 municípios. Médicos vinculados ao Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES) da Universidade Federal da Bahia visitam esta região e dão assistência aos indivíduos acometidos pela leishmaniose. O vilarejo também recebe apoio de agentes de saúde, residentes na vila, que são treinados para visitar famílias e recrutar pacientes para realização de pesquisas e acompanhamento clínico.

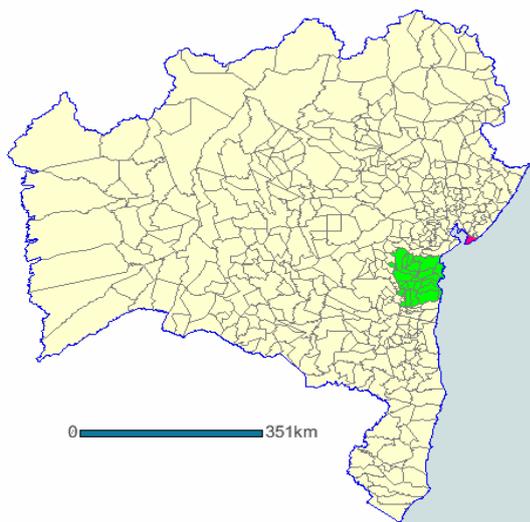


Figura 1- Localização da região de Corte de Pedra-BA. **Fonte:** Google imagens



Figura 2- Centro de referência em Leishmaniose Dr. Jackson M.L.Costa - Corte de Pedra - BA

V.2 DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo de corte transversal, onde indivíduos residentes de uma área endêmica para LTA foram selecionados após aceitação para participar do estudo. No total foram incluídos 24 pacientes, sendo 12 indivíduos diagnosticados com LD e 12 indivíduos diagnosticados com LC e 5 indivíduos saudáveis.

V.3 DEFINIÇÃO DOS CASOS

V.3.1 Leishmaniose disseminada (LD)

A LD é definida com a presença de 10 ou mais lesões com características variadas (papulares, acneiformes e ulceradas) em pelo menos duas regiões distintas do corpo. O diagnóstico foi realizado pela detecção do DNA do parasito em biópsias das lesões através da Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa (qPCR) (Weirather *et al.*, 2011), da cultura do aspirado da lesão, do achado das lesões típicas e histopatologia compatível com leishmaniose tegumentar.

V.3.2 Leishmaniose cutânea (LC)

A LC é definida como a presença de uma ou duas lesões ulceradas na pele, sem evidência de envolvimento da mucosa. O diagnóstico foi realizado pela detecção do DNA do parasito em biópsias das lesões através da qPCR (Weirather *et al.*, 2011), da cultura do aspirado da lesão, do achado das lesões típicas e histopatologia compatível com leishmaniose tegumentar.

V.3.3 Controles sadios (CS)

Os indivíduos sadios são definidos como indivíduos não residentes na área endêmica de Corte de Pedra-BA, sem apresentarem diagnóstico para outras doenças infecciosas e sem possuírem história pregressa de LTA e que aceitaram participar do estudo.

V.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com LD e LC foram incluídos com base nos critérios clínicos já relatados. Foram incluídos pacientes de qualquer gênero, com idade superior a 18 anos e inferior a 60, residentes na área endêmica de Corte de Pedra, com diagnóstico de LD e LC e com presença de lesões não superior a 60 dias e virgens de tratamento.

V.5 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

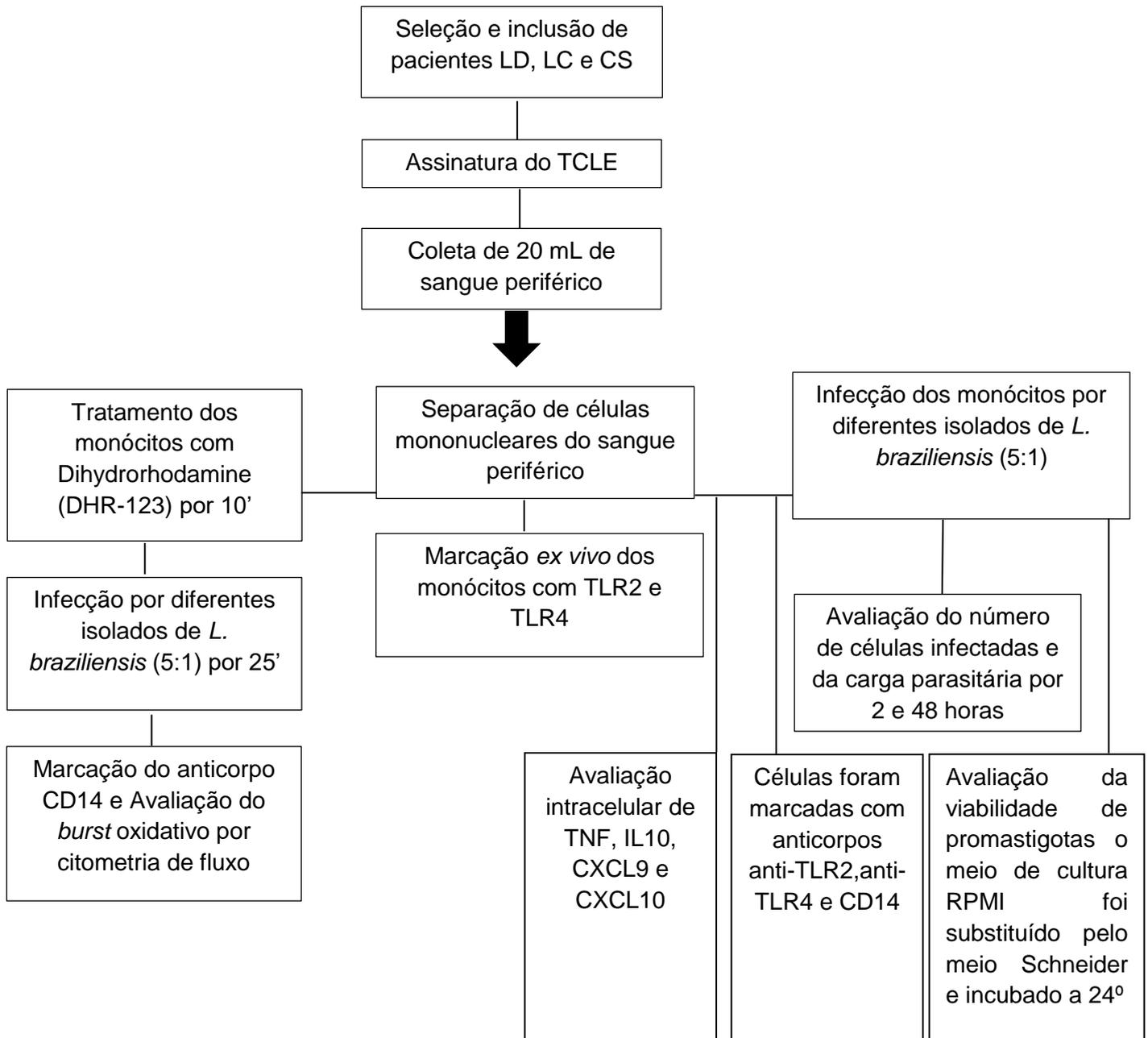
Não foram incluídos pacientes que faziam uso de drogas imunossupressoras ou que apresentaram alguma condição que pudesse causar alteração na resposta imune. Pacientes com sorologia positiva para HIV e portadores de doenças debilitantes como insuficiência renal, insuficiência hepática e diabetes mellitus, assim como pacientes com idade inferior a 18 anos e gestantes, também não foram incluídos no estudo.

V.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia, sob o parecer 2.114.874 (Anexo IV). Todos os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). (Anexo II)

V.7 METODOLOGIA

V.7.1 Fluxograma Representativo da metodologia



V.7.2 Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

Foram coletadas 20 mL de sangue periférico heparinizado de pacientes com LD, LC, e indivíduos sadios e diluídos 1:2 em solução salina estéril a 0.9%. As células foram separadas por gradiente de densidade, utilizando Ficoll Hypaque™ Plus (GE healthcare, Biosciences AB Durham, NC, USA), centrifugadas a 1490 rpm por 30 minutos. Após a separação, as células foram aspiradas e lavadas três vezes com solução salina estéril a 0,9% a 1490 rpm. As células foram contadas através da câmara de Neubauer, ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células por tubo para citometria de fluxo e ressuspensas em meio RPMI (RPMI 1640, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10 UI/mL de gentamicina e 10% de Soro Bovina Fetal (Gibco Laboratories, invitrogen™ América do Sul).

V.7.3 Preparação dos diferentes Isolados de *L. braziliensis* para infecção

Foram utilizados parasitos de *L. braziliensis* LTCP 19512 (isolado de pacientes com LD) e LTCP 11245 (isolado de pacientes com LC) caracterizados quanto à espécie pelo método de eletroforese de enzima multicolus (Cupolillo *et al.*, 1994) e quanto a diversidade genética (Schriefer *et al.*, 2004). Estes isolados foram obtidos a partir de uma lesão da pele de um paciente com LD e de um paciente com LC proveniente da região de Corte de Pedra. Os isolados de *L. braziliensis* 19512 e 11245 foram retirados do nitrogênio líquido e após o descongelamento foram transferidos para o meio Schneider, e mantidos em cultura em estufa a 24°C. Durante sete dias o crescimento da cepa foi acompanhado realizando a contagem de promastigotas viáveis com o intuito de avaliar os diferentes estágios de

crescimento da *L. braziliensis* e a chegada da fase estacionária do parasito. Para a infecção das células, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, ajustados a uma proporção de 5×10^6 parasitos por 1×10^6 células.

V.7.4 Avaliação do grau de infecção e do número de parasitos intracelulares

Para avaliação do grau de infecção e do número de parasitos intracelulares, as CMSP foram infectados com os diferentes isolados LD e LC por duas horas e 48 horas. Após esses períodos as células foram lavadas, ressuspensas em 1ml de salina e uma alíquota de 100ul foi citocentrifugada sobre lâmina de microscopia, por 1 minuto a 1000 rpm. As lâminas foram coradas com Panótico Rápido (LB, Laborclin, PR, Brasil) e a infecção dos monócitos foi avaliada por microscopia óptica, através da contagem do número de monócitos infectados e do número de parasitos internalizados em um total de 100 células.

V.7.5 Viabilidade de promastigotas

Para avaliar a sobrevivência de *L. braziliensis* isoladas de pacientes com LD e LC, as CMSP dos pacientes com LD, LC e CS foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de cinco parasitos por célula durante duas horas. Após esse período, as culturas foram centrifugadas com salina a 0,9% durante 10 minutos a 1000 rpm, para a remoção dos parasitos não internalizados pelos monócitos. As culturas foram ressuspensas em meio RPMI e novamente incubadas por mais 48 horas. Após esse período, o meio RPMI foi substituído pelo meio Schneider (meio de crescimento para o parasito) e incubadas a 24°C

por 48 horas (Novais *et al.*, 2009). Após o período de 48 horas a quantificação das promastigotas viáveis foi feita através da técnica de microscopia óptica em câmara de Neubauer.

V.7.6 Avaliação do *burst* oxidativo em monócitos de pacientes com LD e LC após infecção com *L.braziliensis*

A avaliação da expressão do *burst* oxidativo foi realizada em monócitos derivados de CMSP através da sonda Dihydrorhodamine 123 (DHR-123) (Cayman Chemical Company) que é um indicador de espécies reativas. Os monócitos foram marcados com 10ng/mL de DHR-123 por 10 minutos, incubada a 37°C, com 5% de CO₂. Em seguida, estas células foram infectadas com *L. braziliensis* isoladas de paciente LC e LD na proporção de cinco parasitos para cada monócito ou estimuladas com *Phorbol myristate acetate* (PMA) (10ng/mL) por 25 minutos. Os monócitos foram marcados com anticorpos anti-CD14 (APC BD Pharmingen) e análise foi realizada de acordo com os parâmetros já conhecidos de tamanho (SSC) e granulosidade (FSC). A partir dessa análise é possível selecionar uma população celular com base na expressão dos grupamentos de diferenciação empregados, e também selecionar uma região com a população de interesse a ser utilizada nas análises subsequentes.

V.7.7 Avaliação da expressão de TLR2 e TLR4

A expressão de CD14, TLR2 e TLR4 em monócitos derivados do sangue periférico de pacientes com LD e LC foram analisadas *ex vivo* e *in vitro* após a infecção com parasitos de *L.braziliensis* (5:1) por duas horas. Como controles

positivos para a expressão dos TLRs foram utilizados Lipopolissacarídeo (LPS de 100ng/mL) e Pam3cys-Ser-(Lys)4 (Pam3Cys de 100ng/mL). As células foram incubadas a 37°C, 5%CO₂, por duas horas. Para a marcação de moléculas de superfície foram utilizados os anticorpos CD14 (APC) (eBioscience, San Diedo, CA, EUA), TLR2 PE (clone TL2.1) e o TLR4 PE (clone HTA125) (IMGENEX, San Diego, CA, EUA). A análise da expressão dos receptores ocorreu através da técnica de citometria de fluxo, onde foram adquiridos 200.000 eventos por tubo.

V.7.8 Avaliação intracelular de citocinas e quimiocinas

Os monócitos obtidos das CMSP de pacientes com LD e LC foram infectados com promastigotas de *L.braziliensis* (5:1) por uma hora a 37°C 5% CO₂, foi adicionado o BD GolgiStop por 6 horas e em seguida as células foram marcadas com CD14 (APC). Após a marcação da superfície celular e fixação com PFA 2%, foram lavadas com solução salina (0,9% de NaCl) e ressuspensas em BD Perm/Wash 1x por 15 minutos, para a marcação intracelular. Após este período, as células foram lavadas e marcadas com anticorpo monoclonal diluído na concentração 1:10, por 30 minutos e protegidas da luz a 4°C. Em seguida, as CMSP foram lavadas com BD Perm/Wash 1x e ressuspensas em solução salina (0,9% de NaCl). Imediatamente após a marcação as amostras foram processadas no citômetro de fluxo FACS Canto II.

V.7.9 Análise estatística

Os dados obtidos nesse estudo foram analisados estatisticamente pelo software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os dados de citometria de fluxo foram analisados através do software Flowjo (Tree Star) versão 7.6.5. A distribuição das amostras foi determinada através do teste de normalidade e a escolha dos testes foi de acordo com distribuição não-paramétrica, as análises entre grupos de participantes do estudo foram feitas através do teste U de Mann-Whitney, a comparação estatística entre condições diferentes no mesmo indivíduo foi realizada por teste T de Wilcoxon. Os dados foram representados em mediana e o ponto de corte para significância estatística foi estabelecido valor de $p < 0,05$.

VI. RESULTADOS

VI.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram avaliados 12 pacientes com leishmaniose disseminada e 12 pacientes com leishmaniose cutânea, residentes na região endêmica de Corte de Pedra. Foram incluídos cinco controles sadios (CS), residentes em área não endêmica de transmissão de *L.braziliensis*.

Os aspectos clínicos da população estudada mostrou que a lesão única ulcerada foi o aspecto predominantemente nos pacientes com LC, enquanto nos pacientes com LD o número de lesões variou de 14 a 569 lesões. A LD tem sido observada predominantemente em pacientes adultos do sexo masculino com uma média de idade maior que a observada na LC.

Os dados epidemiológicos e clínicos da população estudada estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Aspectos epidemiológicos e clínicos da população estudada

	Pacientes com Leishmaniose Disseminada (n=12)	Pacientes com Leishmaniose Cutânea (n=12)	Valor de P
Gênero, (%), masculino	11/12 (91,6%)	8/12 (66,6%)	0.3168
Idade, Média (DP)	36±13	34±14	0.6596
Duração da doença, (dias) mediana, (IQ)	38(32-120)	32(20-90)	0.2105
Número de lesões, mediana, (IQ)	60 (14-569)	1 (1-7)	0.0002

DP: Desvio Padrão; IQ: Intervalo interquartil

VI.2 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO E DA CARGA PARASITÁRIA EM MONÓCITOS DE PACIENTES LD E LC APÓS A INFECÇÃO COM OS DIFERENTES ISOLADOS DE *L. braziliensis*

Para avaliar a capacidade de infecção dos diferentes isolados de *L. braziliensis* nos monócitos de pacientes com LD e LC, essas células foram infectadas nos períodos de duas e 48 horas. O número de células infectadas e o número de parasitas intracelulares foram avaliados através de microscopia óptica.

No período de duas horas de infecção (figura 3A) nos monócitos de pacientes com LD não houve diferença estatística na frequência de células infectadas com isolado de LD e LC, 16% (9 -27) e 20% (14-28), respectivamente, $p>0.05$. Entretanto após 48 horas de infecção, a frequência de monócitos de pacientes com LD infectados com isolado LD foi maior, 17% (8-35) quando comparado com isolado LC, 11% (3-25), $p<0.05$. Resultados semelhantes foram observados nos monócitos de pacientes com LC (figura 3A). No período de duas horas de infecção, nos monócitos de pacientes com LC infectados com isolado LD não houve diferença estatística na frequência de células infectadas, 14% (4-27) quando comparado com isolado de LC, 7% (1-27), $p>0.05$. Entretanto no período de 48h de infecção foi observado um percentual maior nos monócitos de pacientes com LC infectados com isolado de LD, 17% (10-27) quando comparado com o isolado LC, 12% (3-21), $p<0.05$.

Na avaliação do número de parasitas intracelulares (figura 3B) não houve variação estatisticamente significativa no período de duas horas nos monócitos de pacientes com LD infectados com isolado de LD, 25 (5-46) quando

comparado com o isolado LC, 30 (19-49). $p > 0.05$. Entretanto, no período de 48 horas de infecção com isolado de LD, foi observado um maior número de parasitos intracelulares 40 (23-88) quando comparado o isolado de LC 28 (6-59), $p < 0.05$.

Nos monócitos de pacientes com LC (figura 3B) também não houve diferença estatística após duas horas de infecção com isolados LD e LC, 19 (10-54) e 12 (2-44), respectivamente. Entretanto no período de 48h de infecção, semelhante ao observado com monócitos de LD, o número de parasitos intracelulares foi maior nas células infectadas com isolado LD, 27 (20-76) quando comparado com isolado LC, 20 (5-42), $p < 0.05$.

Resultados semelhantes foram observados nas células de indivíduos sadios. Não foram observadas diferenças significativas quando foi avaliada a infecção e a carga parasitária nas células infectadas com os isolados de LD e LC no período de duas horas. Entretanto no período de 48h de infecção, a frequência de monócitos de indivíduos sadios infectados com isolado LD foi maior, 34% (21-49) quando comparado com isolado LC, 25% (18-33), $p < 0.05$ e a carga parasitária, foi maior nas células infectadas com isolado LD, 51 (21-65) quando comparado com isolado LC, 31 (22-56), $p < 0.05$.

Não foram observadas diferenças significativas quando foi avaliada a infecção e a carga parasitária entre os monócitos de pacientes com LD, LC e CS infectados com os diferentes isolados de *L. braziliensis*.

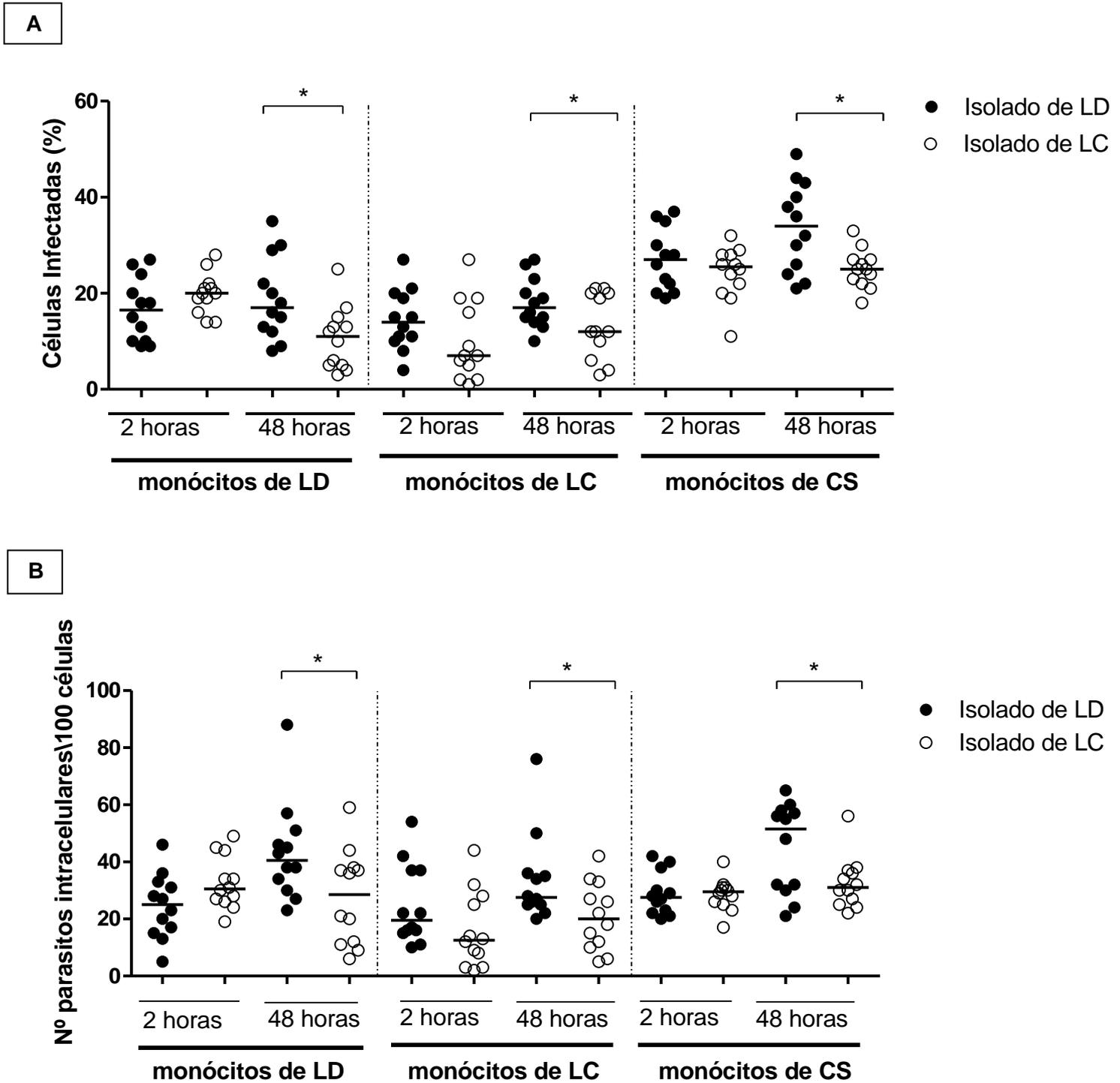


Figura 3- Avaliação da infecção e da carga parasitária de monócitos após a exposição por diferentes isolados de *L.braziliensis*: Os monócitos de pacientes com LD (n=12), LC (n=12) e CS (n=12) foram infectados com diferentes isolados de *L.braziliensis* na proporção de 5:1 nos períodos de duas e 48 horas de infecção. A figura A representa o número de células infectadas. A figura B representa a carga parasitária, obtida através da contagem de parasitas intracelulares, As lâminas foram coradas com Giemsa e a avaliação da infecção dos monócitos foi realizada através da microscopia óptica. Os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney. (* $p < 0.05$).

VI.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS DIFERENTES ISOLADOS DE *L. braziliensis* NOS MONÓCITOS DE PACIENTES COM LD E LC

Para avaliar a capacidade dos monócitos de pacientes com LD e LC em conter a infecção, nós investigamos a sobrevivência dos diferentes isolados de *L.braziliensis* após 48 horas de infecção (figura 4). Após esse período, o número de promastigotas viáveis no meio extracelular de culturas infectadas com isolado de LD foi maior, 129 (55-265) quando comparado com o número de promastigotas viáveis do isolado de LC, 42 (12-154), $p<0.01$. Resultados semelhantes foram observados quando avaliamos os monócitos de pacientes com LC infectados com isolado de LD, 64 (22.5-225) comparado com isolados de LC, 50 (10 -180), $p<0.05$.

Não foram observadas diferenças significativas quando foi avaliada a sobrevivência do parasito entre os monócitos de pacientes com LD e LC infectados com os diferentes isolados de *L.braziliensis*.

A sobrevivência do parasito em monócitos de controles sadios infectados com isolado de *L.braziliensis* de paciente LD também foi maior, 51 (26-76) do que a observada em culturas infectadas com isolado de LC, 19 (5-46), $p<0.01$.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos LD, LC e CS.

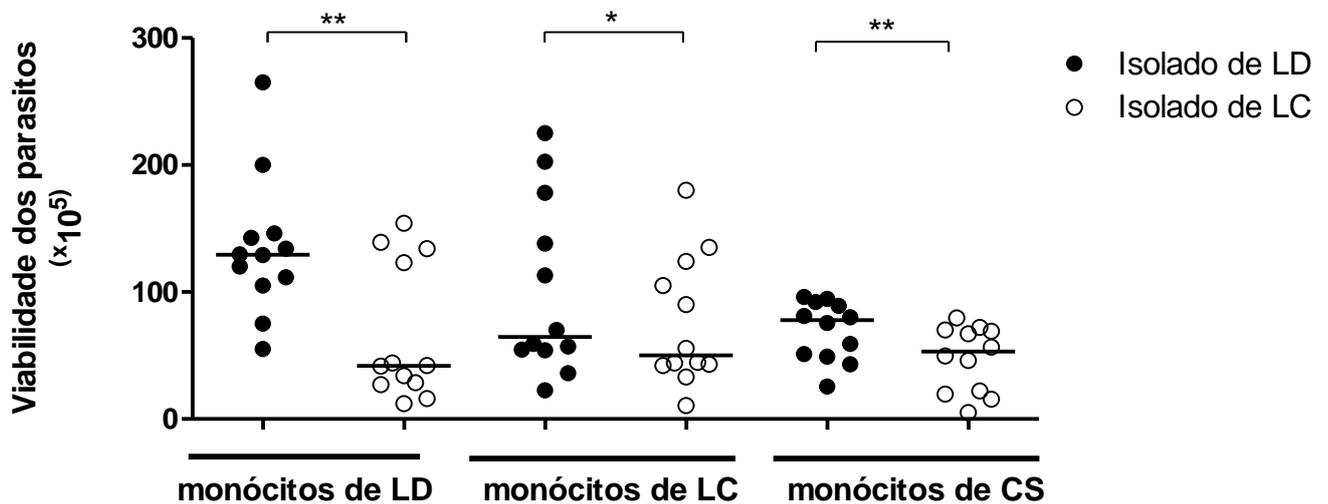


Figura 4- Viabilidade das promastigotas extracelulares nos monócitos de pacientes com LD e LC após infecção dos diferentes isolados de *L. braziliensis*: Os monócitos de pacientes com LD (n=12), LC (n=12) e CS (n=12) foram infectados com os diferentes isolados de *L. braziliensis* por 48 horas. Após esse período o meio RPMI foi substituído pelo meio de cultura Schneider por mais 48 horas. O número de promastigotas viáveis nas culturas foi avaliado através da técnica de microscopia óptica. O teste estatístico utilizado foi o teste de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney. *p<0.05 **p<0.01.

VI.4 AVALIAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO POR MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE DISSEMINADA E PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA APÓS INFECÇÃO POR DIFERENTES ISOLADOS *L. braziliensis*

Os monócitos de pacientes com LD e LC foram marcados com anticorpos anti-CD14 e a expressão do *burst* oxidativo após a infecção por diferentes isolados de *L. braziliensis* foi avaliada com o marcador Dihidrorodamina 123 (DHR) através da técnica de citometria de fluxo.

Inicialmente, os monócitos foram avaliados de acordo com tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H). Para confirmar o isolamento da população de monócitos, estes foram identificados de acordo com a marcação dos anticorpos anti-CD14. (Figura 5A)

A média de intensidade de fluorescência (MFI) da produção do *burst* oxidativo por monócitos de pacientes com LD infectados com isolado de *L. braziliensis* de paciente LD foi maior, 4490 (746-17140) do que a observada nos monócitos desses pacientes infectados com isolado de *L. braziliensis* de paciente com LC, 2503 (650-5650), $p < 0.05$. A produção do *burst* oxidativo por monócitos de pacientes com LC infectados com isolado de LD também foi maior, 3405 (103-6700), que a observada quando os monócitos foram infectados com o isolado de LC, 862 (48 -4400), $p < 0.01$. (figura 5B)

A produção do *burst* oxidativo por monócitos de controles sadios infectados com isolado de LD foi maior, 3702 (1009-11462) do que observada em células infectadas com isolado LC, 701(654-1284), $p < 0.05$.

Não foram observadas diferenças significativas quando foi avaliada a produção do *burst* oxidativo entre os monócitos de pacientes com LD, LC e CS infectados com os diferentes isolados de *L.braziliensis*.

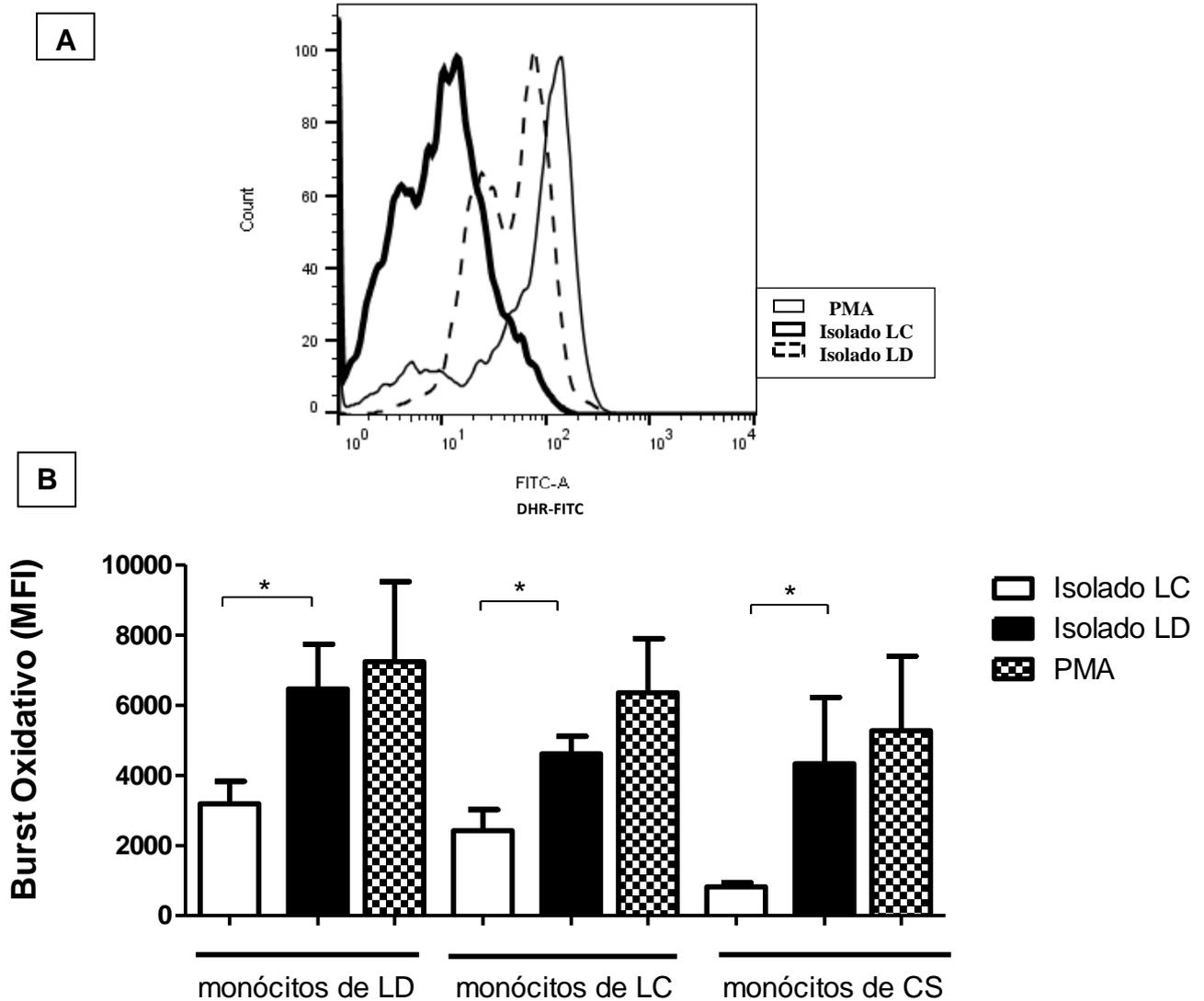


Figura 5- Expressão do *burst* oxidativo por monócitos de pacientes com leishmaniose disseminada e monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea: Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LD (n=12), LC (n=12) e CS (n=5) foram marcadas com anti-CD14. O DHR foi utilizado para avaliar a expressão do *burst* oxidativo pelos monócitos após a infecção por *L. braziliensis* através da técnica de citometria de fluxo e a análise foi feita através do programa FlowJo. (A) Histograma representativo. (B) Expressão de DHR nos monócitos de pacientes com LD e LC. Como controle positivo foi utilizado o PMA. Todos os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney. **p*<0.05 ***p*<0.01.

VI.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO *ex vivo* DE TLR2 E TLR4 NOS MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE DISSEMINADA E LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Os monócitos do sangue periférico de pacientes com LD e LC foram marcados com anticorpos anti-CD14, anti-TLR2 e anti-TLR4. Inicialmente os monócitos foram selecionados de acordo com o tamanho (FSC-H) e a granulosidade (SSC-H). Para confirmar o isolamento da população de monócitos foram utilizados anticorpos anti-CD14. A expressão dos TLR2 e TLR4 foi avaliada após a marcação dos monócitos com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4, como representado na figura 6A. A expressão dos receptores foi avaliada através da Média de Intensidade de Fluorescência (MFI).

Não houve diferença estatística na expressão desses receptores *ex vivo* (figura 6B) entre os grupos LD e LC. Entretanto, a expressão de TLR2 nos monócitos de pacientes com LD, 386 (144-2472) e de pacientes com LC, 387 (198-2132), foi maior quando comparada com a expressão nos monócitos de controles sadios 22 (11-39). Não foi observada diferença estatística na expressão *ex vivo* de TLR4 entre os grupos.

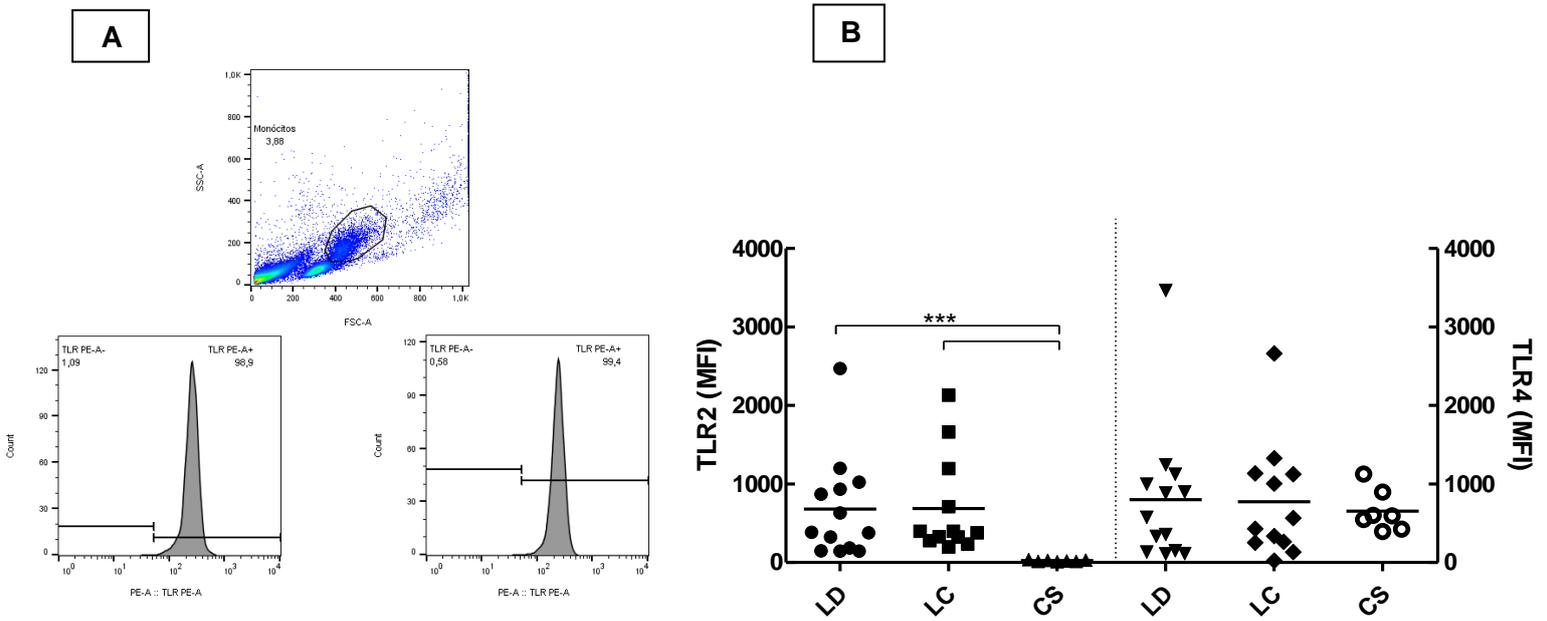


Figura 6- Expressão *ex vivo* de TLR2 e TLR4 nos monócitos de pacientes com LD e LC: Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LD (n=12), LC (n=12) e controles sadios (n=7) foram marcados com anticorpos anti-CD14 para a identificação dos monócitos e em seguida com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4 (Figura A). Os dados foram coletados usando citometria de fluxo e analisados usando o software FLOWJO. A expressão *ex vivo* de TLR2 e TLR4 foi avaliada em células CD14+ (Figura B). Os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Mann Whitney.

VI.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TLR2 E TLR4 APÓS A INFECÇÃO DE MONÓCITOS COM OS DIFERENTES ISOLADOS DE *Leishmania braziliensis*

Para avaliar se a infecção com os diferentes isolados de *Leishmania braziliensis* alterava a expressão desses receptores nos monócitos de pacientes com LD e LC, nós avaliamos a expressão destes receptores após a infecção *in vitro* com promastigotas de *L. braziliensis* isoladas de pacientes com LD e LC. Como controle positivo da expressão dos TLR2 e TLR4 foram utilizados moléculas agonistas dos receptores, o Pam3Cys e o LPS respectivamente.

Em monócitos de pacientes com LD, após a infecção com o isolado de LD a expressão de TLR2 foi maior quando comparado com as células não infectadas ($p < 0,01$) e quando comparado com a expressão em células infectadas com o isolado LC, 1923 (274-2357) *versus* 895 (287-1744), $p < 0,05$. Entretanto nas células de pacientes com LC não houve diferença estatística significativa entre os dois isolados (figura 7A). A expressão de TLR4 após a infecção com o isolado de LD foi maior quando comparado com as células não infectadas. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de TLR4 entre os isolados de *L. braziliensis* (figura 7B). Também não foram observadas diferenças na expressão de TLR2 e TLR4 entre monócitos de pacientes com LD e LC infectados com os diferentes isolados de *L. braziliensis*.

Nos monócitos de controles sadios, após a infecção com o isolado de LD a expressão de TLR2 foi maior, 56 (43-62), quando comparado com a

expressão em células infectadas com o isolado LC, 40 (24-55) $p < 0.05$. A expressão de TLR4 após a infecção com o isolado LC, 930 (360-991) foi maior quando comparado com a expressão em células infectadas com o isolado de LD, 757 (119-941) $p < 0.05$.

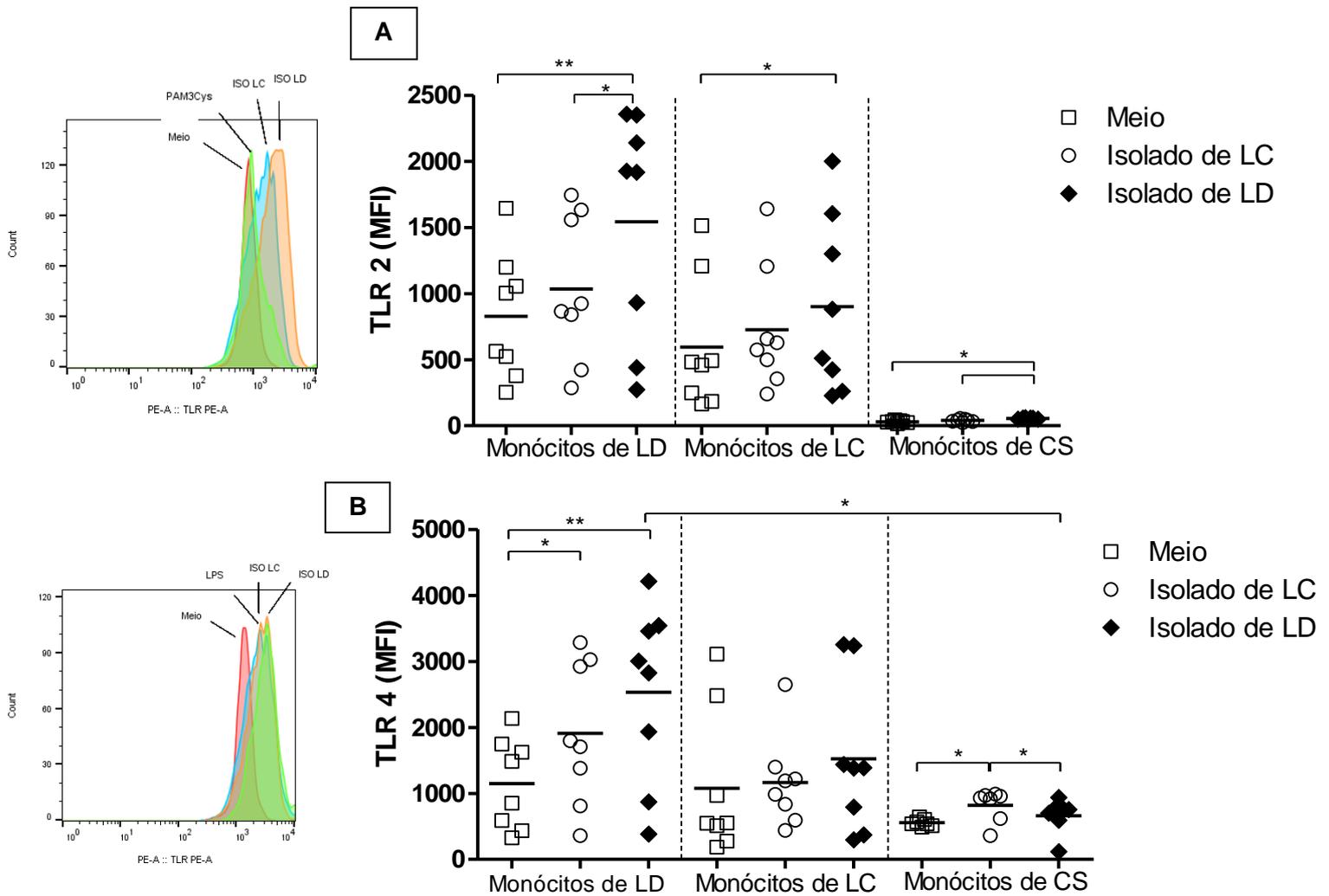


Figura 7- Expressão de TLR2 e TLR4 nos monócitos de pacientes com LD e LC após a infecção dos diferentes isolados de *L. braziliensis*: Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LD (n=8), LC (n=8) e CS (n=7) foram infectados com os diferentes isolados de *L. braziliensis* (5:1) por 2 horas e em seguida as células foram marcadas com anticorpos anti-CD14 para a caracterização dos monócitos e a expressão dos receptores foi avaliada após a marcação com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4. Como controle positivo da infecção foi utilizado o Pam3Cys (agonista de TLR2) (Figura A) e o LPS (agonista de TLR4) (Figura B). A expressão dos receptores foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. Os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

VI.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DAS CITOCINAS EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE DISSEMINADA E LEISHMANIOSE CUTÂNEA

O isolado de LD induziu uma maior expressão de TNF nas células de pacientes com LD, 125(59-329) quando comparado com células não infectadas, 59(24-93) $p < 0.01$. Entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os isolados de *L. braziliensis*. Também não foram observadas diferenças no grupo de pacientes com LC (figura 8A). Em relação à expressão de IL-10, os isolados de LD e LC induziram uma maior expressão dessa citocina nas células de pacientes com LD quando comparado com monócitos não infectados, mas não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os isolados de *L. braziliensis*. Nas células de pacientes com LC não houve diferença estatística significativa na expressão de IL-10 (figura 8B). Não foram observadas diferenças significativas quando foi avaliada a expressão de TNF e IL-10 entre os monócitos de pacientes com LD e LC infectados com os diferentes isolados de *L. braziliensis*.

Nas células de controles sadios o isolado de LD induziu uma maior expressão de TNF, 336 (260-545) quando comparado com células não infectadas, 219 (111-340). O mesmo foi observado com o isolado de LC, 320 (248-378) $p < 0.05$. Entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os isolados de *L. braziliensis*. Em relação à expressão de IL-10, o isolado de LD 92 (74-110) induziu uma maior expressão dessa citocina comparado com o isolado de LC 68 (52-116), $p < 0.05$

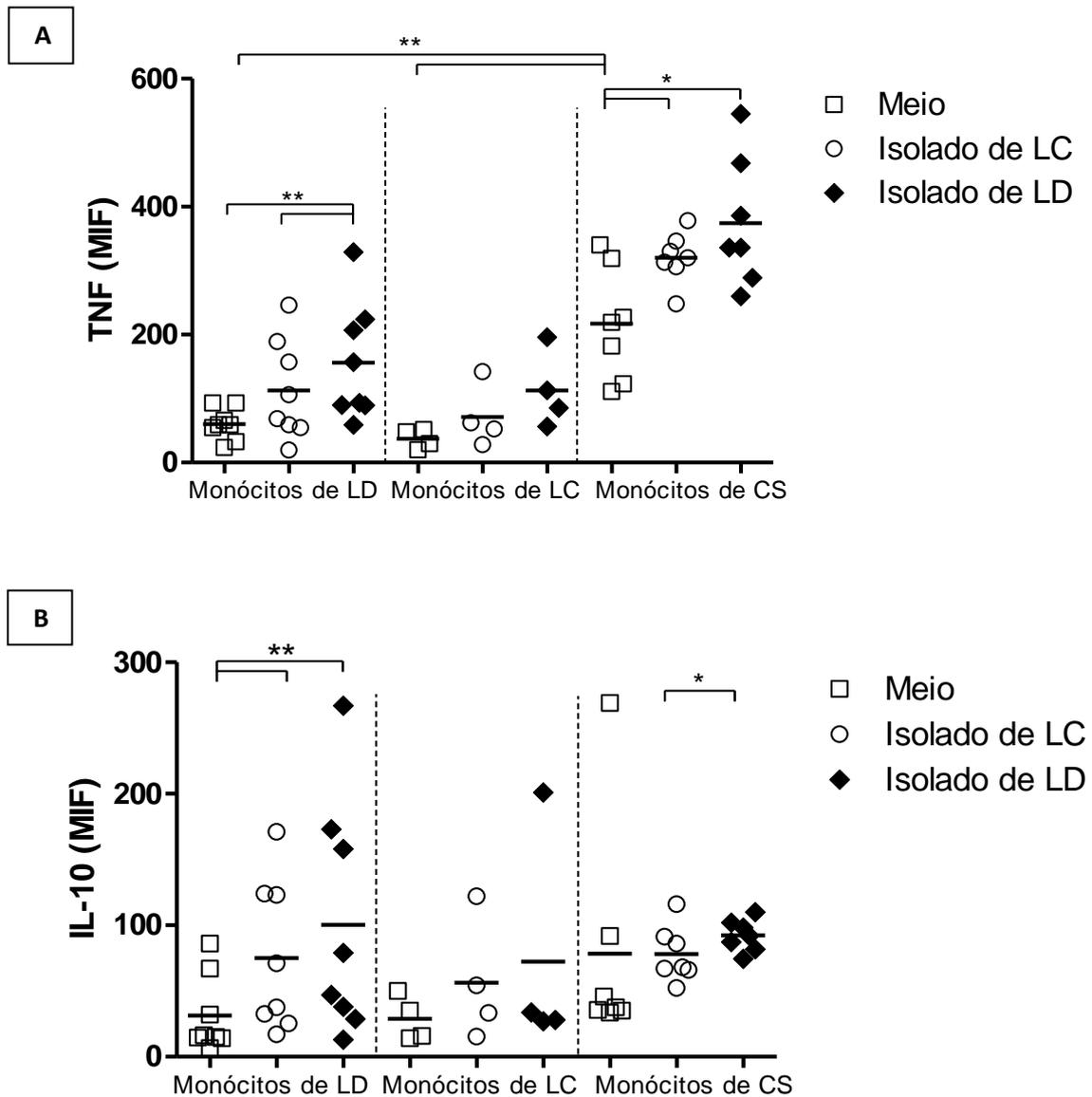


Figura 8- Produção intracelular de TNF e IL-10 em monócitos de pacientes com LD e LC infectados com os diferentes isolados de *L.braziliensis*: Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LD (n=8), LC (n=8) e CS (n=7) foram infectados com os diferentes isolados de *L.braziliensis* (5:1) por um período de duas horas. A avaliação da produção de TNF (A), IL-10 (B) foi realizada através da técnica de citometria de fluxo após 6 horas de cultura com o Stop Golgi e em seguida marcação dos anticorpos. Os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

VI.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DAS QUIMIOCINAS CXCL9 E CXCL10 EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE DISSEMINADA E LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Nos monócitos de pacientes com LD infectados com isolados de LD e LC, foi observado um aumento na expressão de CXCL9, quando comparado com as células não infectadas, $p < 0.05$. E esse aumento foi maior após a infecção com o isolado de LD quando comparado com o isolado LC, 76 (50-401) *versus* 67 (25-207), $p < 0.05$. Não houve diferença na expressão dessa quimiocina por monócitos de pacientes com LC com os diferentes isolados (figura 9A)

Em relação à expressão de CXCL10, em monócitos de pacientes com LD, os isolados de LD e LC induziram uma maior expressão desta quimiocina quando comparado, com células não infectadas, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre diferentes isolados de *L.braziliensis*. (figura 9B). Similarmente ao observado com CXCL9, não foi observada diferenças na produção de CXCL10 em monócitos de pacientes com LC infectados com os diferentes isolados.

Não foram observadas diferenças significativas quando foi avaliada a expressão de CXCL9 e CXCL10 entre os monócitos de pacientes com LD e LC infectados com os diferentes isolados de *L.braziliensis*.

Nas células de controles sadios foi observada uma maior expressão de CXCL9 após a infecção com o isolado de LD, 105 (79-138) quando comparado com o isolado LC, 96 (83-142) $p < 0.05$. Em relação à expressão de CXCL10, o isolado de LD induziu uma maior expressão dessa quimiocina, 150(126-331) quando comparado com células não infectadas, 137(58-304). $p < 0.01$.

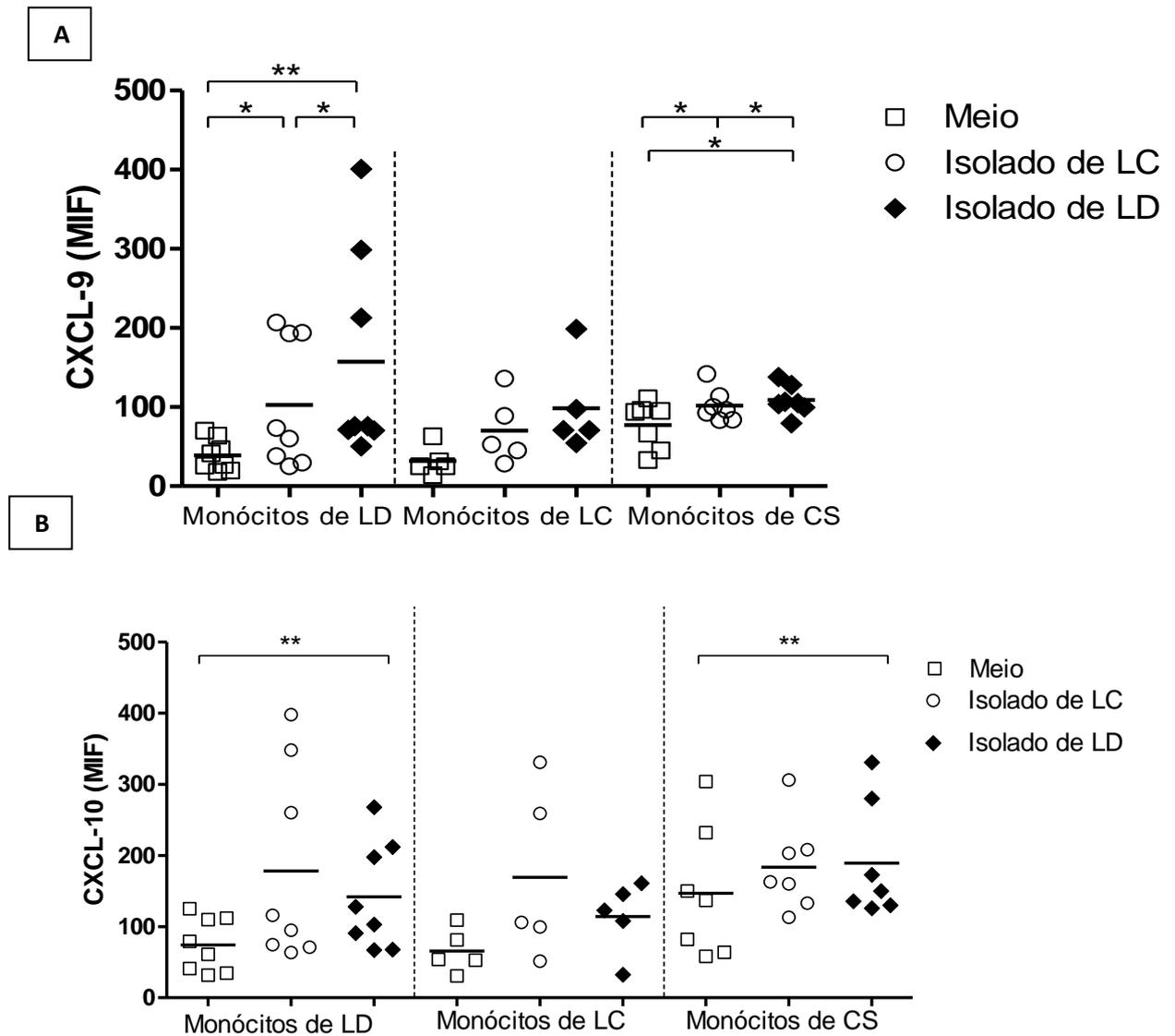


Figura 9- Avaliação da produção intracelular das quimiocinas CXCL9 e CXCL10: Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LD (n=8), LC (n=8) e CS (n=7) foram infectados com os diferentes isolados de *L.braziliensis* (5:1) por um período de duas horas. A avaliação da produção de CXCL9 (A), CXCL10 (B) foi realizada através da técnica de citometria de fluxo após 6 horas de cultura com o Stop Golgi e em seguida marcação dos anticorpos. Os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

VII. DISCUSSÃO

A proteção ou o desenvolvimento de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* estão fortemente associados com a resposta imune do hospedeiro. É bem documentada a capacidade do IFN- γ , uma citocina produzida por células Th1, em ativar macrófagos para destruir leishmania (Scott *et al.*,1988). A diminuição de uma resposta Th1 está associada com o aparecimento da leishmaniose visceral e da leishmaniose cutânea difusa, doenças causadas no novo mundo pela *L. infantum* e *L. amazonensis*, respectivamente. (Carvalho *et al.*, 1985 ; Bomfim *et al.*, 1996) . Em contraste, uma exagerada resposta inflamatória com grande produção de IFN- γ e TNF e ausência de IL-10, uma citocina reguladora da resposta imune, está associada à patologia observada na LC e LM (Ribeiro-de-Jesus *et al.*,1998; Bacellar *et al.*,2002; Antonelli *et al.*,2005). Além das formas clínicas supracitadas, a *L.braziliensis* pode também causar a LD, doença caracterizada por mais de uma dezena de lesões papulares, acneiformes e lesões ulceradas. Até o momento, a patogênese da LD não está esclarecida. Não existem evidências de que uma diminuição da resposta Th1 esteja associada com a doença (Turetz *et al.*,2002; Machado *et al.*, 2011). Alternativamente, existem diferenças genótípicas entre isolados de *L. braziliensis* obtidos de pacientes com LC e LM com isolados de pacientes com LD e essas características podem estar associadas com a disseminação da doença (Schriefer *et al.*, 2004;Queiroz *et al.*,2012). O objetivo do presente estudo foi comparar o comportamento de *L. braziliensis* isolado de paciente com LD e com isolado de LC em monócitos de pacientes com essas duas formas clínicas. Nossos dados mostram que isolados dessas duas formas clínicas de leishmaniose tegumentar tem

comportamento diferentes com relação à sobrevivência do parasito nos monócitos, produção do *burst* oxidativo, expressão de TLR2 e expressão de citocinas. A principal característica da LD é o aparecimento súbito de um grande número de lesões de diferentes aspectos após a manifestação primária da doença, que é similar à observada na LC, que é caracterizada por uma úlcera bem delimitada com bordas elevadas. Esses aspectos clínicos, como esperado, foram bem diferentes nos pacientes incluídos no presente estudo no qual a lesão única ulcerada foi o aspecto predominante nos pacientes com LC, enquanto nos pacientes com LD variou de 14 a 569 lesões. A LD tem sido observada como maior prevalente em pacientes adultos do sexo masculino com uma média de idade maior que a observada na LC, sugerindo que a transmissão desse parasito ocorra em zonas rurais (Turetz *et al.*,2002). No presente estudo embora tenha havido uma maior predominância do sexo masculino nos pacientes com LD, não houve diferença entre a idade e a frequência de pacientes do sexo masculino nos dois grupos de estudo.

Os monócitos/macrófagos são as principais células que abrigam a *Leishmania* (Revisado por Ueno & Wilson, 2012) e conseqüentemente a sobrevivência ou a morte desse parasita depende da ativação dessas células. Existe uma carência de estudos avaliando o papel dos monócitos na LD. Inicialmente nós comparamos a susceptibilidade de monócitos de pacientes com LD e LC frente à infecção com diferentes isolados de *L. braziliensis*. Enquanto não houve diferença na internalização dos diferentes isolados, desde que o percentual de células infectadas e a carga parasitária foram semelhantes nos monócitos infectados com isolados de LD e LC após duas horas de infecção, o isolado de LD teve maior capacidade de sobreviver nos monócitos

do que isolado LC. Isso foi documentado também pelo maior número de parasitos intracelulares após 48 horas de infecção.

É bem conhecido que *L.braziliensis* é polimórfica, mas existe uma carência de estudos sobre o papel de polimorfismo entre isolados de uma mesma espécie de leishmania na patogênese da LTA. Estudos recentes têm mostrado que diferenças genótípicas observadas principalmente no cromossoma 28 de isolados de *L.braziliensis*, se associam com diferentes formas clínicas da LTA, tais como LC, LM e LD (Schriefer *et al.*,2004). Adicionalmente, tem sido descrito na região de Corte de Pedra o aparecimento de formas atípicas da LC caracterizada principalmente por múltiplas lesões nodulares, lesões vegetantes ou úlceras de grande tamanho, e *L.braziliensis* isoladas dessas lesões atípicas apresentam diferenças genótípicas quando comparados com isolados de *L.braziliensis* obtidas da lesão clássica da LC (Guimarães *et al.*,2016).Um outro aspecto importante com relação à LTA é a alta taxa de falha terapêutica ao antimoniato de meglumina, que é droga de escolha preconizada pelo Ministério da Saúde em determinadas regiões do Brasil, como na área endêmica de Corte de Pedra, onde o presente estudo foi realizado (Machado *et al.*,2002; Prates *et al.*, 2017; Brito *et al.*, 2014). É possível que essa alta taxa de falha terapêutica observada em pacientes com LTA esteja relacionada com as diferenças genótípicas entre diferentes isolados de parasito desde que isolados de LD são mais resistentes *in vitro* ao antimoniato de meglumina do que o isolado de LC (Silva *et al.*,2017). Adicionalmente, estudos realizados no estado de Minas Gerais demonstraram, através da análise por PCR-RFLP, que *L.braziliensis* isoladas de pacientes com lesões atípicas em Minas Gerais são geneticamente diferentes de

L.braziliensis isoladas de pacientes com a lesão clássica (Quaresma *et al.*,2018) e os isolados das lesões atípicas foram mais resistentes *in vitro* ao tratamento com antimoniato de meglumina quando comparado com *L.braziliensis* isoladas de pacientes com a lesão clássica (Rugani *et al.*, 2018). Esta associação entre diferenças genotípicas e falha terapêutica pode explicar a baixa resposta ao tratamento com o antimoniato de meglumina e com anfotericina B. lipossomal em pacientes com LD (Turetz *et al.*,2002; Machado *et al.*,2015).

Um estudo realizado por Giudice *et al.*,2012, comparando a infecção de macrófagos com um isolado de *L.braziliensis* obtido de pacientes com LC mostrou que a capacidade microbicida de células de pacientes com LC e LM foi menor do que o observado com macrófagos de indivíduos com infecção subclínica (SC) causada por *L.braziliensis*. Foi também observado que a penetração de *L.braziliensis* em monócitos de indivíduos com infecção SC é menor quando comparado com monócitos de pacientes com LC (Muniz *et al.*,2016) e um estudo realizado em uma área endêmica de transmissão de *Leishmania (Viannia) panamensis*, mostrou que os macrófagos de pacientes com LC crônica (lesões com mais de 6 meses de duração) e com leishmaniose recorrente foram mais permissivos à entrada do parasito que os indivíduos com infecção sub-clínica sugerindo que esta proteção estava associada a uma maior capacidade dos macrófagos desses indivíduos em controlar a infecção (Bosque *et al.*,2000). Embora esses dados demonstrem claramente que o comportamento de monócitos/macrófagos de diferentes formas clínicas da doença pode justificar a maior ou menor capacidade do hospedeiro em controlar a infecção causada por *Leishmania*, nós não observamos diferenças

com relação a internalização e a sobrevivência de diferentes isolados de *L.braziliensis* quando comparamos os monócitos de LD, LC e controles saudios, indicando a importância das diferenças genóticas do parasito no comportamento da *L.braziliensis* em células fagocíticas humanas.

Um estudo realizado com variantes genéticas de *L.braziliensis* isoladas de pacientes com lesão clássica e paciente com lesões atípicas residentes em uma reserva indígena em Minas Gerais, avaliou o comportamento biológico desses parasitos em hamsters. O estudo revelou padrões distintos no período de aparecimento visível das lesões, no tamanho da lesão e na carga parasitária entre as cepas. A extensão e a densidade do infiltrado inflamatório também foram diferentes, sugerindo que o padrão de comportamento biológicos distintos que foi observado poderia estar associado à diversidade genética entre as cepas (Rêgo *et al.*, 2018).

A sobrevivência da leishmania em células fagocíticas está associada à resistência ou à susceptibilidade aos mecanismos oxidativos, responsáveis pela morte do parasito. Nesse estudo nós avaliamos a capacidade de diferentes isolados de *L.braziliensis* em induzir a produção do burst oxidativo por monócitos de pacientes com LD, LC e de controles saudios. O *burst* oxidativo, representado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico (NO) por monócitos/macrófagos é importante no controle da infecção por leishmania (Channon JY *et al.*, 1984; Miao *et al.*, 2009). Os monócitos são classificados em três subpopulações identificadas como clássicos, intermediários e não clássico baseado na expressão de CD14 e CD16 (Ziegler-Heitbrock *et al.* 2010). Um estudo realizado com monócitos de controles saudios infectados com *L.braziliensis* demonstrou que a produção

ROS foi responsável pelo controle da infecção e que os monócitos clássicos foram as células primariamente responsáveis por esse controle (Novais *et al.*, 2014). Enquanto não há dúvidas com relação à participação de ROS em destruir leishmania, os dados com relação ao NO são controversos. Enquanto no modelo experimental a produção de NO se associa com destruição da leishmania (Assreuy *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1993; Murray, Teitelbaum, 1992) em células humanas a produção de NO tem sido associada com a patologia (Ganster *et al.*, 2001; Carneiro *et al.*, 2016). Embora nossos resultados tenham demonstrado que isolados de LD tem maior capacidade de sobreviver em monócitos humanos, este isolado induziu uma maior produção do burst oxidativo quando comparado com isolado LC em monócitos de pacientes com LD, LC e controles saudáveis, o que não explicaria uma maior capacidade de sobrevivência desse isolado em monócitos humanos. Todavia, além do burst oxidativo vários outros fatores estão relacionados com a capacidade microbicida dos monócitos humanos como produção de enzimas e outras moléculas com capacidade leishmanicida (Van-Assche *et al.*, 2011; Molinedo *et al.*, 2010). Existem similaridades entre a disseminação da *Leishmania* da lesão primária na LD e o desenvolvimento da metástase no câncer. A LD é uma doença metastática e já tem sido descrito o envolvimento de ROS na metástase e progressão de tumores (Wu, 2006; Storz, 2005). Dessa forma, não podemos afastar a possibilidade de que o aumento da produção do burst oxidativo em monócitos infectados com isolados de LD contribua com a metástase de células infectadas com o parasito, e consequente disseminação das lesões para inúmeros locais do corpo dos pacientes.

Os TLRs são glicoproteínas transmembrana do tipo I que desempenham um papel fundamental na resposta imune contra patógenos. Estão presentes em vários tipos celulares principalmente em células da imunidade inata, ativando mecanismos da resposta imediata contra patógenos (Gurung and Kanneganti, 2015). Esses receptores ao serem ativados por PAMPs provocavam a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B e a transcrição de diferentes genes de citocinas pró-inflamatórias como TNF (Barton and Medzhitov, 2003). Alguns dados da literatura apontam para a ação dos receptores Toll-like como fortes indutores da resposta oxidativa na infecção por *Leishmania*. O contato da Lipofosfoglicano (LPG) com o Toll-like receptor 4 (TLR4) estimula a síntese da Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase e o aumento da produção de ROS (Sasada and Johnston, 1983; Gill *et al.*, 2010). Mais recentemente, (Srivastava *et al.*, 2013), demonstraram que a expressão de TLR2, está aumentada nos macrófagos de camundongos infectados por *L.major*, o que se associava com uma maior resposta oxidativa, em especial pelo reconhecimento da LPG pelo TLR2, com a ativação de MyD88 e o aumento da expressão da iNOS (Srivastava *et al.*, 2013). O nosso grupo já tinha documentado que monócitos de pacientes com LC expressavam *ex vivo* mais TLR2 e TLR4 quando comparado com controles saudáveis e a expressão desses receptores foi maior após a infecção com *L.braziliensis* (Carneiro *et al.*,2016). Adicionalmente, a maior expressão de TLR2 e TLR4 foi associada à maior expressão de TNF nas células de pacientes com LC (Polari *et al.*,2019, *Frontiers Immunology*, submetido)

Nós avaliamos a expressão *ex vivo* de TLR2 e de TLR4 em monócitos de pacientes com LD e LC e não observamos diferenças significantes, todavia

após infecção com o isolado de LD, monócitos de pacientes com LD expressaram mais TLR2 quando comparado com células não infectadas e com células infectadas com isolado de LC. Em relação aos monócitos de pacientes com LC, não foram observadas diferenças significantes na expressão desses receptores após a infecção com os diferentes isolados. Esses resultados sugerem que possivelmente o isolado de LD esteja induzindo uma maior expressão desses receptores e conseqüentemente uma maior produção do burst oxidativo em monócitos de pacientes LD. Já tem sido descrito também a associação de TLRs e metástase de tumores (Pandey *et al*, 2015).

Nós avaliamos também a produção de TNF, citocina associada com o desenvolvimento da lesão nos pacientes com LC. Monócitos de pacientes com LD infectados com o isolado de LD expressaram mais TNF quando comparado com células não infectadas, mas não foi observada diferença na produção dessa citocina entre os diferentes isolados. Esse resultado difere do estudo anterior realizado por Leopoldo e colaboradores onde antígeno solúvel preparado com o isolado LD induziu uma maior produção de TNF quando comparado com antígeno obtido de isolado LC em CMSP de pacientes com LC e LD. Uma possível explicação é que no presente estudo, em vez de CMSP, utilizamos monócitos e em vez de antígeno solúvel, avaliamos a influência da infecção por *L.braziliensis*. Adicionalmente, a técnica utilizada também foi diferente. No primeiro estudo foi avaliada a produção da proteína através da técnica imunoenzimática enquanto no presente estudo foi avaliada a expressão intracelular da citocina através da citometria de fluxo. Em relação à produção de IL-10, ambos os isolados induziram uma maior expressão de IL-10 nas células de pacientes com LD, mas não houve diferenças entre os dois isolados.

Além da produção de citocinas pró-inflamatórias, a infecção por *Leishmania* induz a expressão de inúmeros genes relacionados à produção de quimiocinas (Antoniazi *et al.*, 2004; Racoosin and Beverley, 1997; Ritter and Korner, 2002). CXCL9 e CXCL10 são quimiocinas importantes no recrutamento e ativação de células do tipo Th1 e estão envolvidas na patogênese de várias doenças inflamatórias (Hunt and Grau, 2003; Vasquez *et al.*, 2008). Macrófagos de pacientes com LC infectados com *L.braziliensis* produzem mais CXCL9 quando comparado com macrófagos de indivíduos com infecção subclínica e controles saudáveis (Giudice *et al.*,2012). Nós avaliamos também a produção intracelular de CXCL9 e CXCL10 após a infecção de monócitos oriundos de pacientes com LD e LC com os diferentes isolados. Em relação à expressão de CXCL10, em monócitos de pacientes com LD os isolados de LD e LC induziram uma maior expressão desta quimiocina quando comparado com células não infectadas, mas não houve diferença significativa entre os diferentes isolados de *L.braziliensis*. Entretanto, o isolado de LD induziu uma maior produção de CXCL9 por monócitos de pacientes com LD quando comparado com o isolado de LC. Em monócitos de pacientes LC não foi observada nenhuma diferença na produção dessa quimiocina. Na LD já foi documentado que existe uma maior produção sistêmica de CXCL9 quando comparado com a produção sistêmica em pacientes com LC (Machado *et al.*, 2011). Pacientes com melanoma e que desenvolvem metástase cerebral apresentam um aumento de CXCL10 e CXCL9 no líquido cérebro espinhal e essas quimiocinas foram responsáveis pela migração de células TCD8⁺ (Look *et al.*,2014; Harlin *et al.*,2009). Adicionalmente, a expressão de CXCR3 e de

seu ligante CXCL9 foi associada à metástase de células cancerosas do fígado (Ding Q *et al.*,2016).

Nossos resultados sugerem que a prévia documentação que a *L.braziliensis* que causa LD difere geneticamente da leishmania que causa LC é o principal fator em induzir um comportamento diferente entre estes isolados. Embora não tenha sido documentadas diferenças no comportamento dos monócitos entre os grupos, esses achados apontam para a necessidade de se avaliar também se existem diferenças na expressão gênica em células de pacientes com LD e pacientes com LC.

Ainda não se conhecem os mecanismos responsáveis pela disseminação da *L.braziliensis* na LD. Nossos resultados indicam que diferenças genéticas documentadas nos isolados de *L.braziliensis* que causam LC e LD influenciam o comportamento desses parasitos nos monócitos humanos. E a maior capacidade do isolado de LD escapar dos mecanismos de destruição pelos fagócitos e a indução de uma maior produção de CXCL9 podem estar contribuindo para a metástase de macrófagos infectados por *L.braziliensis* e o aparecimento das inúmeras lesões observadas nessa doença.

VIII. SUMÁRIO DE RESULTADOS

1- A frequência de monócitos infectados e a carga parasitária foram maiores após 48 horas de infecção com o isolado de LD quando comparado com o isolado LC em células de ambos os grupos de pacientes.

2- Nos monócitos de LD, LC e CS o número de promastigotas viáveis no sobrenadante de células foi maior com isolado de LD, quando comparado com o número de promastigotas viáveis do isolado de LC.

3- A infecção por *L. braziliensis* isoladas de pacientes com LD induz maior expressão de *burst* oxidativo em monócitos de pacientes com LD, LC e CS.

4- Monócitos de pacientes com LD infectados com isolado de LD expressaram mais TLR2 quando comparado com células não infectadas e com células infectadas com isolado de LC.

5- Monócitos de pacientes com LD infectados com o isolado de LD expressaram mais TNF, IL-10 e CXCL10 quando comparado com células não infectadas, mas não foi observada diferença na produção dessas moléculas entre os diferentes isolados.

6- O isolado de LD induziu uma maior produção de CXCL9 por monócitos de pacientes com LD quando comparado com o isolado de LC.

IX. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo sugerem que as diferenças genóticas da *L.braziliensis* que causa LD podem influenciar o comportamento desse parasito nos monócitos humanos e contribuir para a patogênese da leishmaniose disseminada. E a maior capacidade do isolado de LD escapar dos mecanismos de destruição pelos fagócitos e a indução de uma maior produção de CXCL9 podem estar contribuindo para a metástase de macrófagos infectados por *L.braziliensis* e o aparecimento das inúmeras lesões observadas nessa doença.

X. SUMARY

Introduction: Disseminated Leishmaniasis (DL) caused by *Leishmania braziliensis* is characterized by the presence of 10 or more papular, acneiform and ulcerated lesions. Some studies have shown that evidence of polymorphism of leishmania parasites and *L.braziliensis* isolated from patients with DL, cutaneous leishmaniasis (CL) and mucosal leishmaniasis (ML) are polymorphic, presenting a genetic diversity that is associated with clinical forms of ATL. The soluble antigen obtained from *L.braziliensis* isolates from DL patients induced a greater inflammatory response when compared to antigen obtained from isolates of patients with CL in cells of patients with CL and DL. Studies have shown that monocytes / macrophages from patients with CL and ML behave differently against infection with *L.braziliensis* when compared to cells from healthy controls (HS). There are no studies about the behavior of monocytes in DL. **Objective:** To evaluate the role of monocytes and isolates of *Leishmania braziliensis* genotypically different in the inflammatory response in DL. **Methods:** Monocytes from patients with DL (n=12) and from patients with CL (n=12) were infected with *L. braziliensis* isolates from patients with DL and isolated from patients with CL at a ratio of 5:1. The evaluation of the degree of infection and the parasite load was evaluated after cytopspin preparations by optical microscopy. To analyze the survival of different *L. braziliensis* isolates in monocytes from DL and CL patients, the number of viable promastigotes was quantified on the culture supernatant by optical microscopy. The evaluation of oxidative radical production was performed by oxidation of Dihydrorhodamine 123 (DHR-123) and analyzed by flow cytometry. Expression of TLRs and cytokines / chemokines was assessed by flow cytometry. **Results:** The monocyte frequency of DL patients infected with DL isolate and parasite load was higher than that observed in monocytes infected with the CL isolate after 48 hours of infection. The same was observed in the cells of patients with CL. The number of viable promastigotes in the monocyte supernatant infected with the DL isolate was higher when compared to the CL isolate in both groups. The same was observed in CL monocytes. Oxidative burst production by DL monocytes and CL monocytes infected with DL isolate was higher when compared to CL isolates in DL monocytes and CL monocytes. TLR2 expression was higher in DL monocytes after infection with DL isolate when compared to CL isolate. The production of CXCL9 was higher after infection with the DL isolate when compared to the CL isolate.

Conclusions: These results suggest that the genotypic differences of *L.braziliensis* causing DL and CL can influence the behavior of this parasite in human monocytes and contribute to the pathogenesis of the disease.

Keywords: isolated from *Leishmania braziliensis*; Disseminated leishmaniasis;

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS one* 7, 2012; e35671.
2. Anderson, K.V., Jurgens, G., and Nusslein-Volhard, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985; 42, 779-789.
3. Antonelli, L.R., Dutra, W.O., Almeida, R.P., Bacellar, O., Carvalho, E.M., and Gollob, K.J.. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology letters*. 2005; 101, 226-230.
4. Antoniazzi, S., Price, H.P., Kropf, P., Freudenberg, M.A., Galanos, C., Smith, D.F., and Muller, I. Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with *Leishmania major*. *Infection and immunity*, 2004; 72, 5168-5174
5. Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Europe The Journal of Immunology*, 1994; 24(3):672-6.
6. Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W.O., Gollob, K.J., and Carvalho, E.M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity*. 2002; 70, 6734-6740.
7. Barton, G.M., and Medzhitov, R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*. 2003; 300, 1524-1525.
8. Basano, S.A. & Camargo, L.M.A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Rev. Bras. Epidemiol.* Vol. 7, Nº 3
9. Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A.P., Cabrera, N., *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and biochemical parasitology*, 2003; 130, 65-74.
10. Bomfim, G., Nascimento, C., Costa, J., Carvalho, E.M., Barral-Neto, M., M., and Barral, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Experimental parasitology* 1996; 84, 188-194.
11. Bosque, F., Saraiva, N.G., Valderrama, L. and Milon, G., Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scand J Immunol*, 2000. 51(5): p. 533-541.
12. BRASIL. Portal Saúde. Casos de LTA. 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTACasos14.pdf> Acesso em: 29 Janeiro 2019.
13. Brito, G., Dourado, M., Polari, L., Celestino, D., Carvalho, L.P., Queiroz, A., Carvalho, E.M., Machado, P.R., and Passos, S. Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifyline.

- The American journal of tropical medicine and hygiene* 2014; 90,617-620.
14. Buchmüller, Y.; Mael, J. Studies on the mechanisms of macrophage activation: possible involvement of oxygen metabolites in killing of *Leishmania enrietti* by activated mouse macrophages. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 1981; 29(3):181-192.
 15. Carneiro, P.P., Conceição, J., Macedo, M., Magalhaes, V., Carvalho, E.M., and Bacellar, O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PloS one*. 2016; 11, e0148084.
 16. Carvalho EM, Badaró R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD Jr. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest*. 1985; 76(6): 2066-2069.
 17. Carvalho, E.M., Barral, A., Costa, J.M., Bittencourt, A., and Marsden, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica*. 1994; 56, 315-325.
 18. Channon, J.Y.; Roberts, M. B.; Blackwell, A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology*, 1984; 53(2):345-55.
 19. Cuba Cuba CA, Miles MA, Vexenat A, Barker DC, MCMahon Pratt D, Butcher J, Barreto AC, Marsden PD. A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil: characterization and identification os *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985; 79(4): 500-507.
 20. Cupolillo, E., Grimaldi, Jr. G., Momen, H., Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of leishmania. *Molecular and Biomechemical Parasitology*. 1995; 73(1-2):145-155.
 21. Cupolillo, E., Grimaldi, G., Jr., and Momen, H. A General Classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1994; 50, 296-311.
 22. Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996; 91(2): 225-9.
 23. Ding Q, Xia Y, Ding S, Lu P, Sun L, Liu M. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the metastasis of CD133+ liver cancer cells induced by CXCL9. *Oncotarget*. 2016; 22;7(12):14405-14.
 24. Dos-Santos, A.L., Carvalho-Kelly, L.F., Dick, C.F., and Meyer-Fernandes, J.R. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. *Experimental parasitology*, 2016; 167, 67-75.

25. Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB Jr. Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 1993; Jul 15;151(2):907-15.
26. Faria, M.S., Reis, F.C., and Lima, A.P. Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters? *Journal of parasitology research*, 2012; 930257.
27. Galvão CE, Silva AC, Saldanha AC, Silva CM, Costa Mdo R, Costa JM.. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia braziliensis* in the state of Maranhao, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1993; 26(2): 121-123.
28. Ganster RW, Taylor BS, Shao L, Geller DA. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001; 17:98(15):8638-8643.
29. Gill, R., Tsung, A., and Billiar, T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free radical biology & medicine*. 2010; 48, 1121-1132.
30. Giudice, A., Vendrame, C., Bezerra, C., Carvalho, L.P., Delavechia, T., Carvalho, E.M., and Bacellar, O.. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC infectious diseases*. 2012; 12, 75.
31. Gontijo, B., and de Carvalho Mde, L. [American cutaneous leishmaniasis]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2003; 36, 71-80.
32. Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, 1993; 230-250.
33. Guerra, C.S., Silva, R.M., Carvalho, L.O., Calabrese, K.S., Bozza, P.T., and Corte-Real, S. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. *International journal of experimental pathology*, 2010; 91, 451-459.
34. Guimaraes, L.H., Queiroz, A., Silva, J.A., Silva, S.C., Magalhaes, V., Lago, E.L., Machado, P.R., Bacellar, O., Wilson, M.E., Beverley, S.M., Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. *Plos neglected tropical diseases* . 2016; 10, e0005100.
35. Gurung, P., and Kanneganti, T.D. . Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cellular microbiology*, 2015; 17, 1286-1294.
36. Harlin H., Yuru Meng, Amy C. Peterson², Yuanyuan Zha, Maria Tretiakova, Craig Slingluff, Mark McKee, and Thomas F. Gajewski. Chemokine Expression in Melanoma Metastases Associated with CD8+ T-Cell Recruitment. *Cancer Res*. 2009; 1:69(7).

37. Hunt, N.H., and Grau, G.E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in immunology*. 2003; 24, 491-499.
38. Ives, A., Ronet, C., Prevel, F., Ruzzante, G., Fuertes-Marraco, S., Schutz, F., Zangger, H., Revaz-Breton, M., Lye, L.F., Hickerson, S.M., *et al.* Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*, 2011 331, 775-778.
39. Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM. Epidemiological and clinical changes in American tegumentar leishmaniasis in na área of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86(3):426-433.
40. Jones T.C., Johnson WD Jr., Barreto A.C., Lago E., Badaro R., Cerf B., Reed S.G., Netto E.M., Tada M.S., Franca T.F. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *The Journal of infectious diseases*. 1987; 156(1):73-83.
41. Kropf, P., Freudenberg, M.A., Modolell, M., Price, H.P., Herath, S., Antoniazzi, S., Galanos, C., Smith, D.F., and Muller, I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and immunity*, 2004a; 72 1920-1928.
42. Kropf, P., Freudenberg, N., Kalis, C., Modolell, M., Herath, S., Galanos, C., Freudenberg, M., and Muller, I. 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*, 2004b; 76, 48-57.
43. Kumar, R., Singh, O.P., Gautam, S., Nysten, S., and Sundar, S. Enhanced expression of Toll-like receptors 2 and 4, but not 9, in spleen tissue from patients with visceral leishmaniasis. *Parasite immunology*, 2014; 36, 721-725.
44. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A.. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86, 973-983.
45. Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, de Jesus AR, Ho JL, Guimarães LH, Bacellar O, Carvalho EM. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis.* 2006; 25;6:75.
46. Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Schriefer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007; 73(6):843-847.
47. Lessa, H.A., Lessa, M.M., Guimaraes, L.H., Lima, C.M., Arruda, S., Machado, P.R., and Carvalho, E.M. A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2012; 106, 376-381.

48. Lok E, Chung AS, Swanson KD, Wong ET. Melanoma brain metastasis globally reconfigures chemokine and cytokine profiles in patient cerebrospinal fluid. *Melanoma Res.* 2014; 24(2): 120-30.
49. Machado P, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clinical infectious diseases.* 2002 34(12):E69-73.
50. Machado PR, Rosa ME, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schriefer A, Texeira MM, Bacellar O, Carvalho EM. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105(8):438-444.
51. Machado PR, Rosa ME, Guimarães LH, Pratos FV, Queiroz A, Schriefer A, Carvalho EM. Treatment of Disseminated Leishmaniasis with Liposomal Amphotericin B. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 61, Issue 6, 15 2015, 945–949.
52. Marsden PD. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Parasitol Today.* 1985; 1(5):129-133.
53. Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91, 295-298.
54. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 2009; 15; 47(4):344-56.
55. Mollinedo F, Janssen H, de la Iglesia-Vicente J, Villa-Pulgarin JA, Calafat J. Selective fusion of azurophilic granules with Leishmania-containing phagosomes in human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010; 5; 285(45):34528-34536.
56. Moser, B., and Willmann, K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Annals of the rheumatic diseases.* 2004; 63 Suppl 2, ii84-ii89.
57. Muniz AC, Bacellar O, Lago EL, Carvalho AM, Carneiro PP, Guimarães LH, Rocha PN, Carvalho LP, Glesby M, Carvalho EM. Immunologic Markers of Protection in Leishmania (Viannia) braziliensis Infection: A 5-Year Cohort Study. *J Infect Dis.* 2016; 15; 214(4):570-576.
58. Murray H.W., Teitelbaum RF. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, 1992; 165(3):513-7.
59. Murray, H.W., and Cartelli, D.M. Killing of intracellular Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *The Journal of clinical investigation*, 1983; 72, 32-44.

60. Murray, H.W., Zhang, Y., Zhang, Y., Raman, V.S., Reed, S.G., and Ma, X. Regulatory actions of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 in *Leishmania donovani* infection in the liver. *Infection and immunity*, 2013; 81, 2318-2326.
61. Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, de Oliveira CI. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *The Journal of Immunology*, 2009; 15;183(12):8088-98. 2009.
62. Novais, F.O., Carvalho, A.M., Clark, M.L., Carvalho, L.P., Beiting, D.P., Brodsky, I.E., Carvalho, E.M., and Scott, P.. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1beta production. *PLoS pathogens*. 2017; 13, e1006196.
63. Novais, F.O., Nguyen, B.T., Beiting, D.P., Carvalho, L.P., Glennie, N.D., Passos, S., Carvalho, E.M., and Scott, P. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J Infect Dis*, 2014; 209(8): p.1288-1296.
64. Oliveira F, Báfica A, Rosato AB, Favali CB, Costa JM, Café V, Barral-Neto M, Barral A. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trp Med Hyg*. 2011; 85(1):70-73.
65. Oliveira, W.N., Ribeiro, L.E., Schrieffer, A., Machado, P., Carvalho, E.M., and Bacellar, O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*, 2014; 66, 127-132.
66. Pandey S., Saurabh S., Vandana A., Anant N., K. Natarajan and Bilikere S. Pattern Recognition Receptors in cancer Progression and Metastasis. *Cancer Growth and metastasis*. 2015; 8 25-34.
67. Passos, S., Carvalho, L.P., Costa, R.S., Campos, T.M., Novais, F.O., Magalhaes, A., Machado, P.R., Beiting, D., Mosser, D., Carvalho, E.M., and Scott, P. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections. *The Journal of infectious diseases*. 2015; 211, 274-282.
68. Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1981; 127(4):1438-43.
69. Prates FV, Dourado ME, Silva SC, Schrieffer A, Guimarães LH, Brito MD, Almeida J, Carvalho EM, Machado PR. Fluconazole in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*: A Randomized Controlled Trial. *Am J Infect Dis*. 2017; 1;64(1):67-71.
70. Qadoumi, M., Becker, I., Donhauser, N., Rollinghoff, M., and Bogdan, C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infection and immunity*, 2002; 70, 4638-4642.

71. Quaresma, Patrícia Flávia, Cristiana Ferreira Alves de Brito, Jeronimo Marteleto Nunes, Rugani, Janaína de Moura Freire, Rodrigo de Paula Baptista, Elizabeth Castro Moreno, Raquel Carvalho Gontijo, Felipe Dutra Rego, Joaquim Edemilson Diniz, Maria Norma Melo and Célia Maria Ferreira Gontijo. Distinct genetic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. *Parasitology*. 2018.
72. Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PR, Carvalho EM, Riley LW, Wilson ME, Schriefer A. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. *Journal of clinical microbiology*. 2012; 50(12): 4028-4034.
73. Racoosin, E.L., and Beverley, S.M. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Experimental parasitology*. 1997; 85, 283-295.
74. Rêgo, Felipe Dutra, Ana Cristina Vianna Mariano da Rocha Lima, Agnes Antônia Sampaio Pereira, Patrícia Flávia Quaresma, Marcelo Antônio Pascoal-Xavier, Jeffrey Jon Shaw, Célia Maria Ferreira Gontijo. Genetic variant strains of *Leishmania (Viannia) braziliensis* exhibit distinct biological behaviors. *Parasitology Research*, 2018.
75. Reithinger R, Dujardin JC, Louizir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(9):581-596.
76. Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R.P., Lessa, H., Bacellar, O. and Carvalho, E.M. .Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research* 1998; 31, 143-148.
77. Ritter, U., and Korner, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*. 2002; 24, 295-301.
78. Rittig MG, Bogdan C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today*. 2000;16(7):292-297.
79. Rugani JN, Quaresma PF, Gontijo CF, Soares RP, Monte-Neto RL. Intraspecies susceptibility of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions. *Biomed Pharmacother*. 2018;108:1170-1180.
80. Sacks, D.; N. Noben-Trauth. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews. Immunology*. 2002; 2(11): 845- 858.
81. Santos D, Campos TM, Saldanha M, Oliveira SC, Nascimento M, Zamboni DS, Machado PR, Arruda S, Scott P, Carvalho EM, Carvalho LP. IL-1 β Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. *J Invest Dermatol*. 2018; 138(5):1107-1115.

82. Sasada, M., Pabst, M.J., and Johnston, R.B., Jr. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide producing NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry*. 1983; 258, 9631-9635.
83. Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infection and immunity*. 2004; 72(1): 508-514.
84. Schriefer, A., Guimaraes, L.H., Machado, P.R., Lessa, M., Lessa, H.A., Lago, E., Ritt, G., Goes-Neto, A., Schriefer, A.L., Riley, L.W., and Carvalho, E.M.. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2009; 15, 871- 876.
85. Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R.L., Pearce, E., and Sher, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *The Journal of experimental medicine*. 1988; 168, 1675-1684.
86. Silva SC, Guimarães LH, Silva JA, Magalhães V, Medina L, Queiroz A, Machado PRL, Schriefer A. Molecular epidemiology and in vitro evidence suggest that *Leishmania braziliensis* strain helps determine antimony response among American tegumentary leishmaniasis patients. *Acta Trop*. 2017; 178:34-39.
87. Soares G, Barral A, Costa JM, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased *ex vivo* levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol*. 2006; 79(1):36-9.
88. Srivastava, T., Sharma, M., Yew, K.H., Sharma, R., Duncan, R.S., Saleem, M.A., McCarthy, E.T., Kats, A., Cudmore, P.A., Alon, U.S., and Harrison, C.J. LPS and PAN-induced podocyte injury in an in vitro model of minimal change disease: changes in TLR profile. *Journal of cell communication and signaling*. 2013; 7, 49-60.
89. Storz, P. Reactive Oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience*, 2005; 10, 1881-1896.
90. Turetz, M.L., Machado, P.R., Ko, A.I., Alves, F., Bittencourt, A., Almeida, R.P., Mobashery, N., Johnson, W.D., Jr., and Carvalho, E.M. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *The Journal of infectious diseases*. 2002; 186, 1829-1834.
91. Ueno, N., and Wilson, M.E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in parasitology*, 2012; 28, 335-344.
92. Unger, A., O'Neal, S., Machado, P.R., Guimaraes, L.H., Morgan, D.J., Schriefer, A., Bacellar, O., Glesby, M.J., and Carvalho, E.M. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer

- development with high rate of failure in northeastern Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009; 80, 574-579.
93. Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radical Biology & Medicine*, 2011; 15; 51(2):337-51.
 94. Vargas-Inchaustegui DA¹, Hogg AE, Tulliano G, Llanos-Cuentas A, Arevalo J, Endsley JJ, Soong L. CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun*. 2010; 78(1):301-308.
 95. Vasquez, R.E., Xin, L., and Soong, L. Effects of CXCL10 on dendritic cell and CD4+ T-cell functions during *Leishmania amazonensis* infection. *Infection and immunity*. 2008; 76, 161-169.
 96. Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJ, Oliveira MP, Rutowitsch MS, Da-Cruz AM. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *International journal of dermatology*. 2008; 47(9): 926-932.
 97. Weirather, J.L., Jeronimo, S.M., Gautam, S., Sundar, S., Kang, M., Kurtz, M.A., Haque, R., Schriefer, A., Talhari, S., Carvalho, E.M., et al.. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol* . 2011; 49, 3892-3904.
 98. Whitaker, S.M., Colmenares, M., Pestana, K.G., and McMahon-Pratt, D. *Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4. *Infection and immunity* ,2008; 76, 2149-2156.
 99. World Health Organization. Global Leishmaniasis Update, 2006-2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. *World Health Organization-Weekly epidemiological record*. 2017; 38(92):557-572.
 100. Wu Wen- Sheng. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25:695-705.
 101. Wu, W., Weigand, L., Belkaid, Y., and Mendez, S. Immunomodulatory effects associated with a live vaccine against *Leishmania major* containing CpG oligodeoxynucleotides. *European journal of immunology* , 2006; 36, 3238-3247.
 102. 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. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* .2010; 116, e74-80.
 103. Ziegler-heitbrock. Definition of human blood monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000;Volume 67.

XII.ANEXOS

ANEXO I:

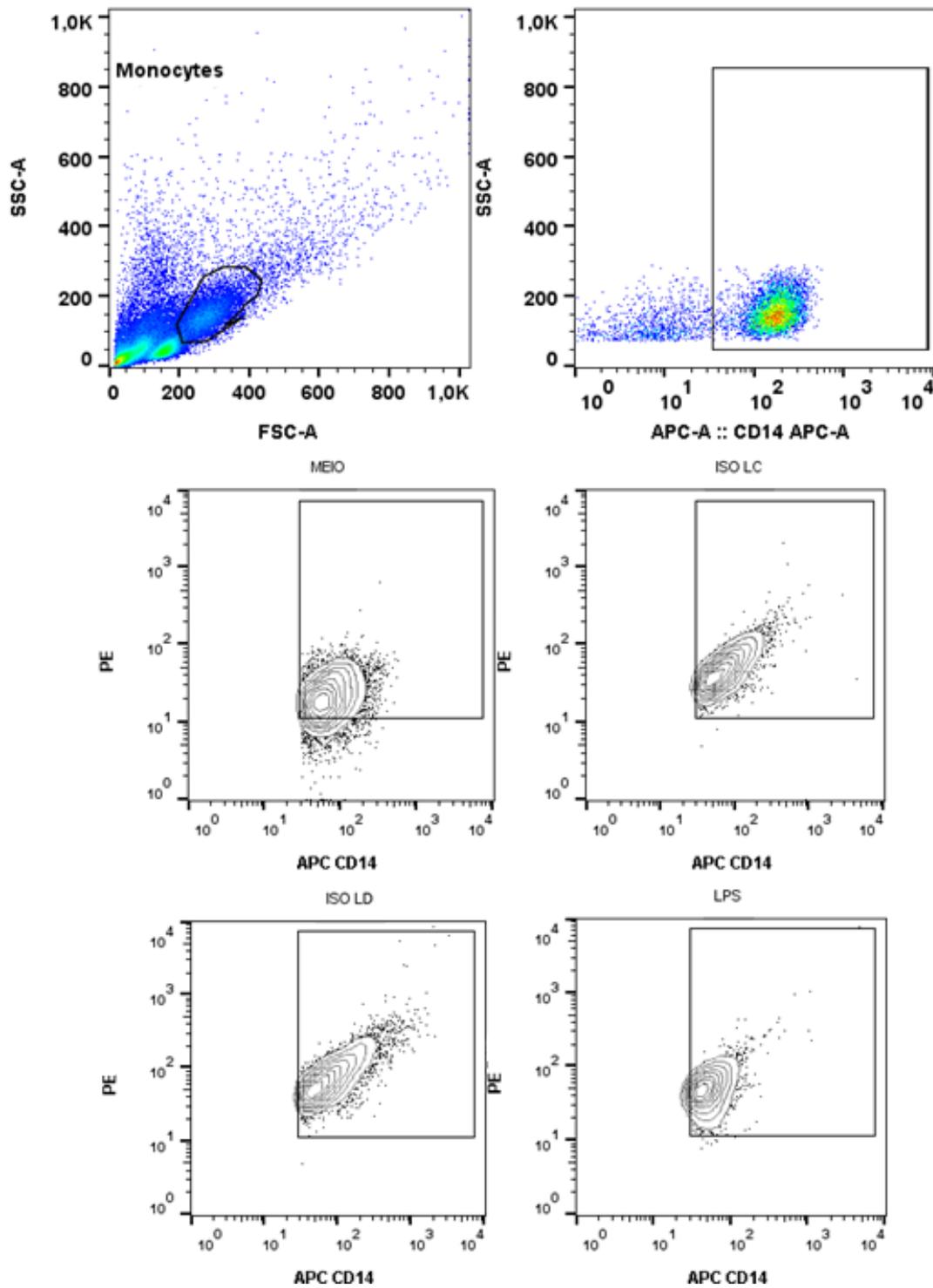


Figura 10- Figura representativa da seleção da população de monócitos.

ANEXO II:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA DISSEMINADA

Nome do Projeto: Inflamação na Patogênese da Leishmaniose Cutânea Disseminada

Investigador Principal: Edgar M. Carvalho, Faculdade de Medicina da Bahia / UFBA Largo do Terreiro de Jesus, s/nº – Centro Histórico. CEP: 40026-010 – Salvador, Bahia – Brasil

Comitê de Ética: Comitê de Ética em Pesquisa–Faculdade de Medicina da Bahia / UFBA Largo do Terreiro de Jesus, s/nº – Centro Histórico. CEP: 40026-010 – Salvador, Bahia – Brasil Tel. (55) 71 3283-5564 e FAX (55) 71 3283-5567.

Horário de funcionamento: Terças e Quintas feiras das 09h00min-12:00horas

Nome do Participante: _____

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 infectadas pela leishmania além de apresentar leishmaniose cutânea também apresentam leishmaniose disseminada. A leishmaniose já é uma doença conhecida nesta região do estudo há muitos anos, com o nome de “leishmania” ou “ferida brava”. É uma doença transmitida por picadas de pequenos mosquitos que deixa uma ou muitas feridas no corpo ou dentro do nariz, que podem demorar mais de três (3) meses para cicatrizar, podendo prejudicar sua saúde e interferir com suas atividades e seu trabalho. 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: Todos os **participantes** com esta doença que procuram o posto de saúde de Corte de Pedra e que apresentam de 1 a mais de 10 feridas e com duração inferior a 60 dias são convidados a participar deste estudo. A sua participação é voluntária. **Você terá um tempo para pensar e/ou conversar com algum familiar, se achar necessário, para lhe ajudar a decidir sobre sua participação no estudo.**

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 cutânea disseminada. 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®) que é fornecido pelo governo.

Finalidade do estudo: Esse estudo está sendo feito porque precisamos conhecer melhor a doença, como nos defendemos contra a leishmania e porque após a infecção pela leishmania desenvolvemos feridas na pele e no nariz. Isto é importante para desenvolver novos tratamentos que estimulem a sua defesa contra o parasito e facilitem a cura da doença. Para isto estudaremos o seu sangue, o parasito que causa a doença quando este for isolado, e 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, será realizada uma biópsia da lesão caso apresente feridas na pele, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença. Se você tiver 10 ou mais lesões será realizada biópsia da primeira lesão e de outra lesão localizada em um local diferente do corpo da primeira ferida. A realização de 2 biópsias será feita para sabermos se a leishmania que causou a primeira ferida é diferente da leishmania que causou a ferida secundária.

Você cederá 30 ml de sangue (mais ou menos 3 colheres de sopa), que será coletado de uma veia de seu braço, através de uma seringa com agulha estéril descartável. **Nós iremos**

separar as células de defesa no sangue e avaliar como elas funcionam depois de infectadas pela leishmania e se essas células são capazes de matar a leishmania.

A retirada do pedaço da ferida na pele para o diagnóstico da sua doença será feita após limpeza do local e anestesia local para você não sentir dor. O fragmento da pele, que mede no máximo cinco (5) milímetros, é retirado utilizando um bisturi adequado chamado "punch". Parte deste material será utilizada 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. Após as análises se houver sobra das suas amostras, essas serão destruídas. Nós não iremos manter nenhuma amostra de participantes do estudo para análise posterior. O tratamento da leishmaniose é gratuito e fornecido pelo governo. Assim, se você decidir por não participar do estudo você terá o mesmo tratamento (Glucantime®) dos indivíduos que participarão do estudo.

Desconfortos e riscos:

Os riscos associados à coleta de sangue incluem formação de hematoma, infecção e síncope. As chances destes riscos são mínimas. Os riscos relativos à realização da biópsia incluem sangramento e infecções. As chances de essas complicações acontecerem são pequenas. Caso algum desses eventos ocorra você terá assistência imediata dos médicos do Posto de Saúde de Corte de Pedra (Dr. Edgar M. Carvalho, Dr. Paulo Machado e Dr. Luiz Henrique Guimarães), e será tratado com medicamento ou procedimento adequado para cada caso, sem nenhum custo para você. No caso de infecção será tratado com o antibiótico adequado.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento e avaliação diagnóstica sua participação no estudo terá a duração de um (1) dia.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica. Está assegurado que você ou qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nos registros ou nas publicações dos resultados do estudo.

Análises de riscos e benefícios: Caso esteja doente, o tratamento que você receberá será o (Glucantime®), medicamento padrão fornecido pelo Ministério da Saúde para tratar a doença. Esse tratamento é igual 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. Os riscos associados à coleta de sangue incluem formação de hematoma, infecção e síncope. As chances destes riscos são mínimas. Os riscos relativos à realização da biópsia incluem sangramento e infecções. As chances de essas complicações acontecerem são pequenas.

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 (Glucantime®) ou com outra droga para tratamento da leishmaniose caso haja necessidade de uso, pois essas drogas são fornecidas pelo governo. No entanto se você quiser participar do estudo, nós ressarciremos todos os gastos relacionados a sua participação, incluindo transporte e alimentação para você e para o seu acompanhante nos dias em que for necessária a sua presença no Posto de Saúde para realização de exames.

Garantia de assistência, acompanhamento, por dano decorrente da pesquisa:

Em caso de você desenvolver alguma complicação relacionada com a sua participação no estudo você será acompanhado por médicos do posto de saúde e pelos **médicos responsáveis pelo estudo** até que os sintomas desapareçam assim como será fornecido os medicamentos necessários sem nenhum custo para você **e para o sistema único de saúde (SUS).**

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

Nome do Projeto: Inflamação na Patogênese da Leishmaniose Cutânea Disseminada

Investigador Principal: Edgar M. Carvalho, professor, Faculdade de Medicina da Bahia / UFBA Largo do Terreiro de Jesus, s/nº – Centro Histórico. CEP: 40026-010 – Salvador, Bahia – Brasil

Comitê de Ética: Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina / UFBA Largo do Terreiro de Jesus, s/nº – Centro Histórico. CEP: 40026-010 – Salvador, Bahia – Brasil
Tel. (55) 71 3283-5564 e FAX (55) 71 3283-5567.

Horário de funcionamento: **Terças e Quintas feiras das 09h00min-12:00horas**

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. **A leishmaniose é uma doença transmitida por picadas de pequenos mosquitos que deixa uma ou muitas feridas no corpo ou dentro do nariz, que podem demorar mais de três (3) meses para cicatrizar.** 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. **Você terá um tempo para pensar e/ou conversar com algum familiar, se achar necessário, para lhe ajudar a decidir sobre sua participação no estudo.**

Finalidade do Estudo: O estudo está sendo feito porque precisamos conhecer melhor a doença, como nos defendemos contra a leishmania. Isto é importante para desenvolver novos tratamentos que estimulem a defesa contra o parasito e facilitem a cura da doença. Para isto estudaremos o seu sangue.

Procedimentos:

Caso concorde em participar do estudo, você doará 30 ml de sangue (mais ou menos 3 colheres de sopa) que será coletado de uma veia de seu braço, através de uma seringa com agulha estéril descartável. Nós iremos separar as células de defesa no sangue e avaliar como elas funcionam depois de infectadas pela leishmania e se essas células são capazes de matar a leishmania.

As amostras obtidas serão armazenadas durante 5 anos, sendo descartadas ao fim deste período. Estas amostras não serão utilizadas em estudos futuros.

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 pode provocar dor leve devido à punção com agulha. Em casos raros se acompanha de sangramento ou mancha na pele. A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados. Os riscos associados à coleta de sangue incluem formação de hematoma, infecção e síncope. As chances destes riscos são mínimas. Caso algum desses eventos ocorra você terá assistência imediata e será tratado com medicamento ou procedimento adequado para cada caso pelos médicos responsáveis pelo estudo, sem nenhum custo para você.

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. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos você pode procurar o Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Bahia (UFBA), cujo endereço

Horário de funcionamento: Terças e Quintas feiras das 09h00min-12:00horas

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor rubricar todas as páginas e assinar o nome abaixo. A você será entregue uma via original deste documento para guardar e a outra ficará com o pesquisador. O pesquisador também rubricará todas as páginas e assinará esse consentimento.

- Sim, eu concordo que a amostra de sangue seja retirada para estudo.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue seja retirada para estudo.

Assinatura do participante

Data

Hora

Assinatura da testemunha

Data

Hora

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discutir 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

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Inflamação na Patogênese da Leishmaniose Cutânea Disseminada

Pesquisador: Edgar Marcelino de Carvalho Filho

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 4

CAAE: 62974916.8.0000.5577

Instituição Proponente: FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA

Patrocinador Principal: National Institute of Allergy and Infectious Diseases

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.114.874

Apresentação do Projeto:

Os itens "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram extraídos do arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_840806.pdf", gerado na Plataforma Brasil em 05.05.2017.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.