

MARINA LUIZA RODRIGUES ALVES

**Avaliação do perfil fenotípico-funcional de monócitos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada, tratados com o antimoniato de N-metil glucamina**

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Agosto/ 2014

MARINA LUIZA RODRIGUES ALVES

**Avaliação do perfil fenotípico-funcional de monócitos de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, tratados com o antimoniato de N-metil glucamina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Co-orientador(a): Dra. Vanessa Peruhype M. Pascoal

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Agosto/ 2014

## **LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO**

Laboratório de Biologia das Interações Celulares – LBIC – UFMG

Laboratório de Pesquisas Clínicas – LPC – CPqRR

Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – LBDM – CPqRR

## **ORIENTAÇÃO**

Orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (LBIC – UFMG)

Co-orientador(a): Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (LBDM – CPqRR)

## **COLABORADORES**

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Laboratório de Biologia das Interações Celulares - LBIC

Walderez Ornelas Dutra

Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR

Centro de Referência em Leishmanioses – CRL

Dra. Maria Camilo Ribeiro de Senna

Dra. Andréia Coutinho de Faria

Rosiana Estéfane da Silva

Laboratório de Pesquisas Clínicas – LPC

Dra. Ana Lucia Telles Rabello

Clóves Asclânio dos Reis Junior

Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – LBDM

Dra. Andréa Teixeira Carvalho

Dr. Olindo Assis Martins Filho

Dr. Matheus Fernandes Costa e Silva

## **AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

Dedico esse trabalho aos meus pais, que sempre batalharam com muita dificuldade e que fizeram o possível e o impossível para me oferecer uma boa educação. Que acreditaram em mim e apoiaram meu gosto pelo estudo. O esforço de vocês sempre foi a minha motivação. Serei eternamente grata pela oportunidade de vida e pela confiança. Espero, através dessa conquista, retribuir um pouco do que fizeram por mim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, e não poderia ser diferente. Minha fonte de vida, amor e esperança. A única certeza que tenho é saber que posso contar com você sempre.

A toda a minha família, principalmente minha mãe June, por todo amor e dedicação integral. Minha eterna heroína, tudo que eu faço é para você, e por você.

Ao Otoni, pela cumplicidade e carinho incondicional. Pela dedicação ao meu projeto como se fosse o seu. Nossa relação é uma verdadeira benção. Em sua companhia, até as horas intermináveis de análises se tornaram mais leves e agradáveis. Obrigada pela parceria de vida e de trabalho.

À Vanessa, pela confiança e amizade de sempre. Pelas oportunidades desde a iniciação científica ao mestrado. Obrigada por me permitir conviver e aprender com você a cada dia de trabalho. Sempre será, para mim, um exemplo de profissional.

Ao Rodolfo, por ter me recebido gentilmente como sua aluna. Por toda atenção e compreensão nos momentos difíceis. Pela contribuição no projeto e por me proporcionar novas oportunidades de conhecimento.

Ao Clóves, pela amizade e convivência harmoniosa nos tempos de LPC. Pela grande contribuição ao projeto, pela dedicação e carinho comigo, desde o meu primeiro dia de laboratório.

Às médicas do ambulatório Maria e Andréia, e a Rose, por ajudarem no recrutamento e avaliação dos pacientes.

Aos pacientes, pois sem eles nada teria sido possível.

A todos do LBDM, principalmente ao Matheus, pela co-orientação durante toda a iniciação científica, período essencial para que eu chegasse ao mestrado. Pelo auxílio e contribuição nas análises.

Aos professores e colegas do LBIC, pela recepção calorosa e convivência agradável e divertida.

As alunas de iniciação científica, Dâmárys pela grande ajuda nos experimentos, Alessandra e Heloisa pela participação no projeto.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse projeto e para o meu crescimento profissional.

Se eu tivesse que escolher um entre todos os sentimentos, certamente escolheria a gratidão. Não há nada mais bonito do que uma pessoa grata. Eu considero como uma virtude das mais nobres. Para mim, a gratidão é o amor que reconhece a importância de atos e palavras proferidas por pessoas especiais. É o delicado conforto de ter sido auxiliada. É o meu eterno e sincero “obrigada”.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Aspectos gerais das leishmanioses .....	2
1.2 Leishmaniose tegumentar .....	2
1.3 Leishmaniose cutânea.....	3
1.4 <i>Leishmania braziliensis</i> e sua transmissão .....	4
1.5 Diagnóstico da leishmaniose cutânea .....	5
1.6 Aspectos terapêuticos da leishmaniose cutânea .....	6
1.7 Aspectos imunopatológicos da leishmaniose cutânea .....	7
2.JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVO.....	14
3.1 Objetivo Geral .....	15
3.2 Objetivos específicos .....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
4.1 Aspectos éticos .....	17
4.2 Caracterização da população avaliada .....	17
4.3 Critérios de inclusão .....	18
4.4 Critérios de exclusão .....	18
4.5 Tratamento específico e critério de cura.....	19
4.6 Exames laboratoriais.....	19
4.6.1 Teste imunológico.....	19
4.6.2 Teste parasitológico .....	20
4.7 Obtenção e marcação de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> .....	21
4.8 Avaliação da interação monócito- <i>Leishmania</i> , do perfil de expressão de marcadores de superfície celular e de citocinas intracelulares de monócitos.....	22
4.9 Avaliação da produção de óxido nítrico .....	26
4.10 Análise dos dados .....	27
4.10.1 Estratégias de análise da interação monócito- <i>Leishmania</i> e do perfil fenotípico-funcional de monócitos do sangue periférico .....	27
4.10.2 Análises de redes de correlações.....	29

4.11 Análise estatística dos dados .....	29
5. RESULTADOS .....	31
5.1 Avaliação da interação monócito- <i>Leishmania</i> de pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada, avaliados antes e após tratamento. ....	31
5.2 Caracterização dos aspectos fenotípicos de monócitos do sangue periférico. ....	32
5.2.1 Avaliação da expressão de receptores Toll 2 e 4 .....	32
5.2.2 Avaliação da expressão de receptores Fc $\gamma$ : CD16, CD32 e CD64 .....	33
5.2.3 Avaliação da expressão dos receptores de IFN- $\gamma$ e IL-10.....	34
5.2.4 Avaliação da expressão da molécula de ativação HLA-DR e dos co-estimuladores CD80 e CD86.....	35
5.3 Caracterização do perfil de produção de óxido nítrico intracelular por monócitos do sangue periférico.....	36
5.4 Caracterização do perfil de produção de citocinas intracelulares por monócitos do sangue periférico.....	37
5.4.1 Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias .....	37
5.4.2 Avaliação da produção de citocinas moduladoras .....	38
5.5 Avaliação dos aspectos funcionais – abordagem longitudinal .....	39
5.6 Correlação entre os aspectos fenotípicos e os aspectos funcionais de monócitos do sangue periférico na presença de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> , avaliados antes e após tratamento.....	40
5.7 Correlação entre os aspectos fenotípicos e os aspectos funcionais de monócitos e tempo de evolução e tamanho das lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada .....	41
6.DISSCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÃO .....	55
8. ANEXOS.....	57
9.REFERÊNCIAS.....	63



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Caracterização da população avaliada.....	18
<b>Tabela 2.</b> Anticorpos utilizados para avaliação da expressão de marcadores de superfície celular.....	23
<b>Tabela 3.</b> Anticorpos utilizados para avaliação da produção de citocinas intracelulares.....	25

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema ilustrativo da seleção e marcação de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*. ..... 22
- Figura 2.** Análise representativa da interação monócito-*Leishmania* por citometria de fluxo. A Figura “A” representa o perfil da população de monócitos, enquanto a Figura “B” representa o perfil de análise da população de monócitos na presença de formas promastigotas de *L. braziliensis*..... 27
- Figura 3.** Análise do perfil fenotípico-funcional por monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.. ..... 28
- Figura 4.** Análise do perfil fenotípico-funcional por monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. .... 28
- Figura 5.** Avaliação da taxa de interação de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* com monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10).. ..... 31
- Figura 6.** Avaliação do perfil de expressão de TLR2 (Figura 6A) e TLR4 (Figura 6B) em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10). ..... 32
- Figura 7.** Avaliação do perfil de expressão de receptores Fc $\gamma$  CD16 (Figura 7A), CD32 (Figura 7B) e CD64 (Figura 7C) em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish<sup>+</sup>).. ..... 33
- Figura 8.** Avaliação do perfil de expressão de receptores de IFN- $\gamma$  (Figura 8A), e IL-10 (Figura 8B) em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish<sup>+</sup>). ..... 34
- Figura 9.** Avaliação do perfil de expressão da molécula de ativação HLA-DR (Figura 9A), e das moléculas de co-estimulação CD80 (Figura 9B) e CD86 (Figura 9C) em

monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por <i>L. braziliensis</i> avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de <i>L. braziliensis</i> (Leish <sup>+</sup> ).....	35
<b>Figura 10.</b> Avaliação dos níveis de NO intracelular em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por <i>L. braziliensis</i> avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10), em culturas de produção basal (PB) e em culturas estimuladas com formas promastigotas vivas de <i>L. braziliensis</i> (Leish <sup>+</sup> ).....	36
<b>Figura 11.</b> Avaliação do perfil de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ (Figura 11A) e IL-12 (Figura 11B) em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por <i>L. braziliensis</i> avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de <i>L.</i> <i>braziliensis</i> (Leish <sup>+</sup> )..	38
<b>Figura 12.</b> Avaliação do perfil de citocinas moduladoras IL-10 (Figura 12A) e TGF- $\beta$ (Figura 12B) em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por <i>L. braziliensis</i> avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de <i>L. braziliensis</i> (Leish <sup>+</sup> ).....	39
<b>Figura 13.</b> Avaliação do perfil de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ /IL-12 e moduladoras IL- 10/TGF- $\beta$ e de NO em monócitos do sangue periférico de pacientes com lesões cutâneas causadas por <i>L. braziliensis</i> avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de <i>L. braziliensis</i> (Leish+.).....	40
<b>Figura 14.</b> Redes de correlações entre biomarcadores fenotípicos e funcionais de monócitos do sangue periférico .....	41
<b>Figura 15.</b> Correlação entre IL-10 <i>versus</i> Tempo de Lesão e CD16 <i>versus</i> Tamanho de Lesão em pacientes com leishmaniose cutânea, antes do tratamento nas culturas realizadas na presença de formas promastigotas vivas de <i>L. braziliensis</i> . .....	42
<b>Figura 16.</b> Resumo das principais alterações fenotípicas-funcionais de monócitos do sangue periférico na presença de formas promastigotas <i>L. braziliensis</i> . .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ADCC	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
AG	Aminoguanidina
ATP	Adenosina Trifosfato
BFA	Brefeldina A
CD	Cluster of Differentiation
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CpqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CRL	Centro de Referência em Leishmanioses
CS	Controle Saudável
DAF-2DA	Diacetato de 4,5-Diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazolofluoresceína
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EPR	Ressonância Eletrônica Paramagnética
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Fluorescência
FSC	Tamanho Celular
GTP	Guanosina Trifosfato
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano
IDRM	Intradermo Reação de Montenegro
IFN-γ	Interferon Gama
IFN-γR	Receptor de IFN-γ
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-10R	Receptor de interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IMF	Intensidade Média de Fluorescência

iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LC	Leishmaniose Cutânea
LC T0	Pacientes com LCL avaliados antes do tratamento
LC T90	Pacientes com LCL avaliados 90 dias após o tratamento
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
Leish	Estímulo com formas promastigotas vivas de <i>L. (V.) braziliensis</i>
LIT	Liver infusion triptose
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeos
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LM	Leishmaniose Mucosa
LV	Leishmaniose Visceral
M	Molar
MFF	Solução Fixadora
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS 1x	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,2
PBS-W	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,2 com 0,5% albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica
PBS-P	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,2 com 0,5% albumina bovina sérica, 0,1% de azida sódica e saponina

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína clorofila piridinina
pH	Potencial hidrogênico
PPRs	Receptores de reconhecimento padrão
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Sb <sup>+5</sup>	Antimonial pentavalente
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	Granulosidade celular
TGF- $\beta$	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TLR	Toll Like Receptor
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa

## RESUMO

Infecções provocadas por *Leishmania braziliensis* apresentam manifestações clínicas diversas e a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) é a mais comum. Apesar da existência de diversos trabalhos que avaliam aspectos específicos da resposta imune celular na LCL humana, ainda são escassos os estudos de avaliação dos eventos imunológicos associados à interação *Leishmania*/fagócitos. Nesse estudo, o principal objetivo foi avaliar a interação de formas promastigotas de *L. braziliensis* com monócitos do sangue periférico e caracterizar os aspectos fenotípicos-funcionais através da avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular (TLR-2, TLR-4, CD16, CD32, CD64, IL-10R, IFN- $\gamma$ R, HLA-DR, CD80 e CD86), do perfil de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e TGF- $\beta$ ) e dos níveis de óxido nítrico intracelulares de monócitos do sangue periférico na ausência e na presença de formas promastigotas de *L. braziliensis*. Foram avaliados voluntários saudáveis (CS, N = 10) e pacientes portadores de LCL atendidos no Centro de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou, no momento da primeira avaliação antes do tratamento (LC T0, N = 10) e 90 dias após tratamento (LC T90, N = 10). Dessa forma, esse estudo amplo, prospectivo, que envolve análises de aspectos fenotípicos-funcionais de monócitos, célula alvo para a *Leishmania*, trata-se de abordagem inédita e que poderá contribuir para melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro no contexto da LT. Os resultados alcançados demonstraram, em monócitos de pacientes avaliados antes do tratamento, baixa produção de TNF- $\alpha$  e NO associada a uma baixa expressão de TLR2, CD32, HLA-DR e CD86, e alta produção de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-10R. Após o tratamento, monócitos demonstraram alta produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO associada a alta expressão de IFN- $\gamma$ R, TLR4, CD64 e CD86, e baixa produção de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-10R. Dessa forma, na doença ativa a resposta imune modulada é importante para o estabelecimento da infecção e para a modulação da resposta inflamatória que se estabelece com a evolução da doença, o que é determinante para indicar o grau de gravidade da doença. Após o tratamento e a cura clínica ficou evidente o papel da resposta pró-inflamatória que, além de ser indicativo da boa resposta ao tratamento, é essencial para evitar a reativação das lesões, estimulando também a capacidade dos monócitos/macrófagos de controlar a infecção no caso de um novo contato com o parasito.

## ABSTRACT

Infections caused by *Leishmania braziliensis* present diverse clinical manifestations and, localized cutaneous leishmaniasis (LCL) is the most common. Although there are several studies that evaluate specific aspects of the cellular immune response in human LCL, there are few published studies evaluating the immunological events associated with the *Leishmania*/ phagocytes interaction. In this study, the primary objective was to evaluate the rate of internalization of *L. braziliensis* promastigotes and characterize the phenotypic and functional aspects, by evaluating the cellular surface markers expression profile (TLR-2, TLR-4, CD16, CD32, CD64, IL-10R, IFN- $\gamma$ R, HLA-DR, CD80 e CD86), cytokine profile (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e TGF- $\beta$ ) and the levels of intracellular nitric oxide in peripheral blood monocytes, in the absence and presence of *L. braziliensis* promastigotes. To achieve the goals, healthy volunteers (CS, N = 10) and LCL patients attended at the Leishmaniasis Reference Center of René Rachou Research Center at the time of the first evaluation before treatment (T0 LC, N = 10) and 90 days after treatment (T90 LC, N = 10), were evaluated. Hence, this wide and prospective study that involves analysis of phenotypic and functional aspects of monocytes, target cell for *Leishmania*, is a unique approach that may contribute to better understanding of the host-parasite relation in the context of LT. The achieved results demonstrate that monocytes from patients evaluated before treatment, showed low production of TNF- $\alpha$  and NO associated with a low expression of TLR2, CD32, HLA-DR and CD86, and high production of IL-10, TGF- $\beta$  and IL-10R. After treatment, monocytes showed a high production of TNF- $\alpha$ , IL-12 and NO associated with an increased expression of IFN- $\gamma$ , TLR4, CD64 and CD86, and low production of IL-10, TGF- $\beta$  and IL-10R. Thereby, in active disease, the modulated immune response is important for the establishment of infection and for the control of the inflammatory response that establishes with the evolution of the disease, which is critical to indicate the degree of disease severity. After treatment and clinical cure, became evident the role of the inflammatory response which, besides is indicative of the good response to treatment, is essential to prevent reactivation of the lesions, thus stimulating the ability of monocyte/macrophages to control the infection in case of a new contact with the parasite.



## **1. INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses referem-se a um espectro de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Os parasitos são transmitidos pela picada de insetos fêmea pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, e gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. O gênero *Leishmania* compreende parasitos intracelulares obrigatórios que se reproduzem por divisão binária, dentro de células fagocíticas mononucleares de mamíferos suscetíveis (Laison *et al.*, 1987). A diversidade de espécies de *Leishmania*, associada à capacidade da resposta imune de cada indivíduo à infecção, está relacionada com as várias formas clínicas das leishmanioses. Em função do caráter espectral das manifestações clínicas, diferentes classificações para a doença já foram propostas (Pearson & Sousa 1996, Grevelink & Lerner 1996). Entretanto a Organização Mundial da Saúde (OMS) divide e caracteriza as leishmanioses em dois grupos: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV).

As leishmanioses estão entre as dez endemias mundiais de prioridade absoluta da OMS devido ao caráter endêmico em 98 países de diversas regiões do mundo, concentradas em áreas tropicais e subtropicais da América, África, Ásia e Europa (David & Craft, 2009; Ameen, 2010; WHO, 2014). O número de pessoas infectadas está estimado em aproximadamente 12 milhões, além disso, cerca de 367 milhões se encontram em risco de adquirir a doença (WHO, 2014).

As leishmanioses, assim como outras doenças parasitárias endêmicas, têm sido relacionadas a áreas de pobreza e escassos recursos humanos e econômicos para seu controle e profilaxia. Porém, cada foco possui particularidades que devem ser avaliadas para que se estabeleçam medidas profiláticas efetivas.

## 1.2 Leishmaniose tegumentar

Considerando as formas de resposta do hospedeiro, a partir do local da picada do vetor e, a localização das lesões e a evolução clínica, Marzochi & Marzochi (1994) propuseram uma classificação clínica para a LT. Assim, a LT foi dividida em duas formas clínicas principais: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM). A leishmaniose cutânea

compreende as formas: cutânea localizada (única / múltipla), cutânea disseminada, recidiva cútis e cutânea difusa. A leishmaniose mucosa por sua vez compreende as formas: mucosa tardia, mucosa concomitante, mucosa contígua, mucosa primária e mucosa indeterminada (MS, 2007). Segundo a OMS, a incidência anual estimada para LT é de 700.000 a 1.2 milhões de casos (WHO, 2014). No Brasil, verificou-se no período de 1985 a 2012, uma média anual de 25.426 casos autóctones de LT, sendo 9.141 no ano 2012 (MS, 2013). No estado de Minas Gerais, desde a década de 1950, época em que a doença foi descrita, os surtos registrados de LT tem sido relacionados, quase exclusivamente, às atividades de desmatamento (Gontijo *et al.*, 2002). Entretanto, a partir da década de 1990, a epidemiologia da doença tem sofrido alterações, sendo descritos casos em áreas periurbanas de cidades de médio e grande porte (Passos *et al.*, 1993; Kawa *et al.*, 2010; Shimabukuro *et al.*, 2010; Bacha *et al.*, 2011; Camara Coelho *et al.*, 2011; Quaresma, 2014), além das áreas de colonização antiga. Minas Gerais apresenta atualmente um dos maiores números de casos de LT dentre os estados brasileiros, onde foram notificados nos anos de 2008 a 2012 – 1.160, 1.047, 1.926, 1.746, 1.041 casos da doença, respectivamente (SES-MG, 2013).

### 1.3 Leishmaniose cutânea

A LC é amplamente distribuída, e cerca de um terço dos casos ocorrem em cada uma das três regiões epidemiológicas: as Américas, a bacia do Mediterrâneo e Ásia Ocidental do Oriente Médio à Ásia Central. Os dez países com o maior número de casos confirmados são o Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, e, juntos, representam de 70 a 75% da incidência de LC em todo o mundo (WHO, 2014).

A LC pode ser causada por qualquer espécie de *Leishmania*, e seu período de incubação varia de 15 dias a 8 semanas. Inicialmente forma-se um nódulo cutâneo único ou múltiplo no local da inoculação, que evolui para a úlcera, geralmente pouco dolorosa. O tamanho da lesão também é variável, podendo alcançar apenas alguns milímetros ou até mesmo mais de 10 centímetros. Além das lesões cutâneas clássicas podem ocorrer casos assintomáticos que são confirmados durante inquéritos epidemiológicos com indivíduos que possuem Intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva, mas que não apresentam cicatrizes nem história de lesões. Existem ainda, relatos de formas subclínicas que evoluem para cura espontânea dentro de 6 a 15 meses, aproximadamente (David & Craft, 2009).

No Brasil, foram identificados sete espécies de *Leishmania* amplamente distribuídas como agentes etiológicos da LC: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*,

*L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (Leishmania) amazonensis* (Grimaldi *et al.*, 1989; Silveira *et al.*, 2002). A espécie *L. braziliensis* está presente em todo o território, e é a principal responsável pela leishmaniose cutânea localizada (LCL) (MS, 2007), forma clínica mais comum. A LCL consiste inicialmente de pápula ou nódulo caracterizado por infiltrado dérmico rico em macrófagos, linfócitos e plasmócitos, que com a evolução da lesão, torna-se ulcerada, redonda ou ovalada, com bordas bem definidas, elevadas e endurecidas (Magalhães *et al.*, 1986; Gutierrez *et al.*, 1991; Weigle *et al.*, 1996). Difere-se da forma cutânea disseminada e da forma cutânea difusa, formas clínicas menos frequentes e que caracterizam espectros mais graves. A carga parasitária nas lesões varia de acordo com a espécie de *Leishmania* infectante e com o estado imunológico do hospedeiro.

#### **1.4 *Leishmania braziliensis* e sua transmissão**

A *Leishmania braziliensis* causa lesões cutâneas e mucosas metastáticas e se distribui amplamente no Brasil, tanto em áreas de colonização recente na Amazônia quanto em antigas do Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (MS, 2006). Alguns autores destacam a *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) como o vetor mais importante no Brasil. Na região sudeste, a transmissão da *L. braziliensis* está associada principalmente aos vetores *Lutzomyia (N.) whitmani* e *Lutzomyia (N.) intermedia*. No entanto, em Minas Gerais, tem sido demonstrado maior número de casos de LC transmitidos por *L. (N.) whitmani*. Essa espécie já foi encontrada em um grande número de áreas endêmicas e em associação com uma ampla diversidade vegetacional (Quaresma, 2014). *L. (N.) whitmani* também foi encontrado no peridomicílio, em chiqueiros e plantações de banana, o que demonstra a habilidade de sobrevivência da espécie em ambiente doméstico (Quaresma, 2014).

A falta de conhecimentos específicos sobre a ecologia dos vetores limita a possibilidade do estabelecimento de novas medidas de controle mais eficazes e a elaboração de modelos preditivos que possam fornecer informações sobre as áreas e períodos de maior risco de transmissão. A *Leishmania* spp. é um parasito digenético (heteroxeno), que circula entre os hospedeiros vertebrados e seus vetores, sob as formas amastigotas (ovais e sem flagelo aparente) dentro das células do sistema mononuclear fagocitário dos mamíferos, e várias formas flageladas no tubo digestivo dos flebotomíneos (promastigotas procíclicas e metacíclicas) (Pinto-da-Silva *et al.*, 2002).

A forma infectante de *L. braziliensis*, assim como nas outras espécies de *Leishmania*, é a promastigota metacíclica, transmitida ao hospedeiro vertebrado através do repasto

sanguíneo do inseto vetor. Primeiramente, quando o flebótomo ingere o sangue com as amastigotas, estas, ao alcançarem o intestino médio ou estômago do vetor, sofrem um primeiro ciclo replicativo e se transformam em formas promastigotas procíclicas flageladas. Estas, também por processos sucessivos de divisão binária, se multiplicam ainda no sangue ingerido, que é envolto por uma membrana peritrófica, secretada pelas células do estômago do inseto. Após a digestão do sangue, a membrana peritrófica se rompe, as formas promastigotas ficam livres e passam a colonizar a região do piloro e ílio, onde permanecem aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal, por meio de hemidesmossomos, com o auxílio do lipofosfoliglicano (LPG). Nesta fase, os parasitos sofrem sucessivas divisões celulares até atingir a fase metacíclica (término do ciclo replicativo), quando ocorrem mudanças estruturais nas moléculas de LPG ancoradas na membrana extracelular do parasito. Os parasitos do gênero *Leishmania* mudam o tamanho ou adicionam ramificações ao LPG, diminuindo a sua afinidade pelo intestino do vetor, dessa forma, deixam o intestino e migram em direção à probóscide do inseto, onde permanecem até o próximo repasto sanguíneo (Kavoosi *et al.*, 2006; Kavoosi *et al.*, 2010). A partir da deposição das formas promastigotas metacíclicas na pele (homem - hospedeiro acidental), inicia-se uma complexa interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro, crucial no estabelecimento/controla da infecção (MS, 2006).

### **1.5 Diagnóstico da leishmaniose cutânea**

O diagnóstico da LC é realizado com base em aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. A utilização de métodos de diagnóstico laboratorial visa à confirmação dos achados clínicos, e oferece importantes informações epidemiológicas, pela identificação da espécie, fornecendo diretrizes em relação às medidas a serem adotadas para o controle do agravo (MS, 2007). O diagnóstico clínico é realizado durante a avaliação médica, precedida de anamnese onde são avaliados os principais dados epidemiológicos como existência de casos na região, procedência de área endêmica (viagem ou antiga residência), referência de cães ou outros mamíferos com lesões sugestivas que residem em áreas próximas, inserção em áreas florestais, entre outros.

Dentre os exames laboratoriais os testes parasitológicos são os procedimentos de primeira escolha por serem mais rápidos, de menor custo e de fácil execução, além disso, são considerados definidores de diagnóstico (MS, 2007). O teste mais utilizado é a visualização por microscopia óptica das formas amastigotas do parasito em espécimes corados obtidos por

escarificação, biópsia com impressão por aposição ou punção aspirativa (MS, 2007). A eficácia deste método depende do tempo de evolução da doença, das espécies de *Leishmania* e do treinamento do microscopista, apresentando sensibilidade muito variável, com valores próximos de 60% em locais de transmissão da *L. braziliensis* (Pirmez *et al.*, 1999; Marques *et al.*, 2006). O estudo histopatológico através da coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE) permite a visualização do parasito em aproximadamente 60% dos casos (Magalhães *et al.*, 1986). A probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, tornando-se rara após um ano. Infecções secundárias contribuem para diminuir a sensibilidade desse método, portanto, devem ser tratadas previamente (MS, 2007). O cultivo do parasito oferece a possibilidade de seu isolamento para futuros ensaios de identificação de espécies ou estudos de resistência a drogas (Romero *et al.*, 1999; MS, 2007).

A IDRМ por ser um teste imunológico de hipersensibilidade tardia, avalia a resposta imune celular na derme, pela medida de endureção da pele 48 a 72 horas após a injeção de antígeno padronizado na face volar do antebraço. O resultado do teste é influenciado pelo estado imunológico do indivíduo, tempo de evolução da doença, espécie de *Leishmania* infectante e pelo antígeno empregado. Um resultado positivo pode significar infecção assintomática, infecção passada ou doença ativa. Pode-se observar resultado negativo nas primeiras quatro a seis semanas após o surgimento da lesão cutânea (MS, 2007). Após a cura clínica, a IDRМ pode permanecer positiva durante vários anos sendo, portanto, de limitado valor para o diagnóstico de reativação (MS, 2007).

Já os métodos moleculares de detecção do DNA (reação em cadeia da polimerase - PCR) de *Leishmania* são sensíveis e específicos para o diagnóstico, especialmente em situações nas quais os parasitos são escassos, como nas lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (Mendonça *et al.*, 2004; MS, 2007). Porém, na rotina de diagnóstico, esse método ainda é pouco utilizado (MS, 2007).

## **1.6 Aspectos terapêuticos da leishmaniose cutânea**

Os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ) são as drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses (MS, 2007). Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido. Acredita-se que interferem no metabolismo bioenergético das formas amastigotas de *Leishmania*, inibindo a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos, reduzindo a produção de ATP e GTP (Berman, 1988; MS, 2007). A exposição das formas amastigotas por quatro horas, nas doses de 150 a 500 mg de  $Sb^{+5}$ /mL, resultaram em um decréscimo de certos

substratos, dose dependente de CO<sub>2</sub>. Quando expostos a 500 mg de Sb<sup>+5</sup>/mL, observou-se queda no nível de produção de CO<sub>2</sub> a partir da glicólise, facilitando a destruição do parasito. Os compostos de antimônio pentavalentes, como o estibogluconato de sódio, exercem pouco efeito sobre as formas promastigotas que crescem em culturas de tecidos. Este acentuado contraste entre as atividades *in vitro* e *in vivo* do composto, sugere que, para exercer a atividade leishmanicida, é necessária a redução de Sb<sup>+5</sup> para Sb<sup>+3</sup>. Outros mecanismos também podem estar envolvidos (MS, 2007).

Segundo a OMS (2012), a dose de antimonial recomendada varia entre 10 e 20 mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia durante 20 dias seguidos, e para o tratamento da forma cutânea, é recomendada a via injetável intra-muscular ou endovenosa. Os dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados são o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio, este último não comercializado no Brasil (MS, 2007). O Glucantime® é indicado para o tratamento de todas as formas clínicas da LT, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. A principal limitação do Glucantime® é a sua toxicidade, que produz efeitos adversos potencialmente graves e fatais (Sampaio *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2005) e impede seu emprego em pacientes com doenças pré-existentes, além de exigir monitoramento cuidadoso de diversas funções orgânicas (Herwaldt & Bermam, 1992). Seus principais efeitos tóxicos são arritmias cardíacas, disfunções renal, hepática e pancreática (Sampaio *et al.*, 1997; Oliveira-Neto *et al.*, 2000; MS, 2007).

A eficácia do Glucantime® na forma cutânea é variável dependendo da região estudada e do esquema de tratamento empregado. O prazo máximo estipulado pelo Ministério da Saúde para reepitelização completa das lesões é de noventa dias, mas os pacientes são acompanhados até doze meses após o término do tratamento para monitoração. Caso não ocorra cicatrização completa após três meses do término do tratamento, o esquema terapêutico é repetido, porém prolongado, com duração de 30 dias. Pacientes que não respondem ao tratamento convencional são tratados com drogas de segunda escolha, como Anfotericina B ou Pentamidina. A cura das Leishmanioses é apenas clínica, uma vez que os parasitos permanecem, em baixa concentração, no corpo do indivíduo por toda a vida (MS, 2007).

### **1.7 Aspectos imunopatológicos da leishmaniose cutânea**

Os macrófagos são as principais células da resposta imune inata, e podem interiorizar e destruir patógenos, instruir a resposta adaptativa através da apresentação de antígenos,

eliminar restos celulares de células mortas, eliminar células apoptóticas durante o desenvolvimento e mediar a reabsorção óssea, como os osteoclastos (Ravetch & Aderem, 2007). Essas células possuem um papel intrigante na leishmaniose, pois servem ao mesmo tempo como células hospedeiras para os parasitos e como células reguladoras da resposta imune equipadas para destruir esses microrganismos.

A interação inicial *Leishmania*-macrófago é fundamental para o estabelecimento da infecção no hospedeiro. Após serem depositadas na pele do hospedeiro, as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* spp. se ligam a receptores específicos e são fagocitadas por macrófagos residentes (histiócitos) e por células polimorfonucleares, como os neutrófilos, que correspondem às primeiras células a migrarem para o local da infecção (Mosser & Rosenthal, 1993). Ao interiorizar as promastigotas, não há multiplicação destas formas do parasito no interior dos neutrófilos. Portanto, supõe-se que essas células sirvam como abrigo temporário para o parasito no momento inicial da infecção. Essas células infectadas secretam quimiocinas que atraem macrófagos para o sítio da infecção. Alguns macrófagos fagocitam os neutrófilos apoptóticos infectados e essa ação resulta na infecção de macrófagos pelo parasito e na liberação de citocinas moduladoras como IL-10 e TGF- $\beta$  (Zandbergen, 2004). Esses parasitos internalizados indiretamente se estabelecem e se multiplicam dentro de fagolisossomos dos macrófagos. Normalmente, esta proliferação ocorre na derme em intensidade dependente de fatores do parasito e do hospedeiro. Em pacientes imunodeprimidos a proliferação pode tornar-se intensa, o que torna possível a visualização de parasitos no tecido conjuntivo da derme em grande quantidade, além de células parasitadas na epiderme (MS, 2006).

Durante a infecção, a atividade leishmanicida de macrófagos ocorre em diferentes momentos. No início, a fagocitose de formas promastigotas pelos macrófagos resulta em ativação de mecanismos oxidativos, com produção de radicais hidroxila, superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (NO), que interagem com a membrana fosfolipídica do patógeno levando-o a morte (Cunningham, 2002; Awasthi, 2004; Wilson, 2005). Posteriormente, os macrófagos quiescentes, parasitados com a forma amastigota, podem ser ativados por citocinas, e então matar o parasito intracelularmente. A grande produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode levar a danos em macromoléculas como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos ou carboidratos, podendo afetar também a função celular (Vouldoukis, 1995).

Assim como outras espécies de parasitos, protozoários do gênero *Leishmania* possuem diversos mecanismos de escape da resposta imunológica do hospedeiro. De acordo com De Souza-Leao *et al.* (1995) e Belkaid, Butcher & Sacks (1998), os parasitos conseguem



promover inibição de determinadas funções exercidas pelos macrófagos, como fagocitose, produção de óxido nítrico e interleucina (IL)-12, bem como a expressão de HLA-DR e, dessa forma, estabelecer a infecção.

Já foi amplamente descrito que o estabelecimento e a evolução das lesões causadas por infecções por *L. brazilienses* são altamente dependentes da imunidade celular (Pirmez *et al.*, 1990; Da-Cruz *et al.*, 1994; Coutinho *et al.*, 1998; Baratta-Masini *et al.*, 2007; Keesen *et al.*, 2011; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2012; Freitas-Teixeira *et al.*, 2012). Porém, o perfil de resposta imune associado à infecção em humanos ainda não está bem determinado. Estudos têm se concentrado na determinação de aspectos importantes da resposta imune na LCL, dentre eles, mecanismos imunológicos associados à resistência natural, à presença de lesão ativa, aos processos de cura espontânea e cura após o tratamento.

Follador *et al.* (2002) avaliaram a resposta imune celular associada com resistência natural à leishmaniose em indivíduos assintomáticos, que apresentavam intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva, mas sem história prévia da doença e sem lesão aparente e observaram que pacientes considerados resistentes apresentavam níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  mais baixos e níveis de IL-5 mais elevados no sobrenadante de cultura de linfócitos, quando comparados à pacientes com lesão ativa. Os autores sugerem que este perfil misto de citocinas poderia modular a resposta imunológica, diminuindo a reação inflamatória e consequentemente o surgimento da lesão. Posteriormente, Baratta-Masini *et al.*, (2007) demonstraram que indivíduos considerados resistentes apresentavam um perfil de citocinas do tipo 0 (IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- $\gamma$ ), com níveis de produção basal. Contudo, estes indivíduos também apresentavam em análises de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de *Leishmania* menor frequência de células T IL-4<sup>+</sup>, elevada razão entre células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL10<sup>+</sup> e altos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato, sugerindo que a maior proporção de citocinas do tipo 1 em relação às do tipo 2 contribui para prevenir o crescimento dos parasitos e o desenvolvimento de lesões. Freitas-Teixeira *et al.* (2012) mostraram em indivíduos MT<sup>+</sup> (positivos para IDRM) maior capacidade leishmanicida *in vitro*, evidenciada pelo aumento de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>, monócitos CD23<sup>+</sup> e maior razão linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>.

Diferentes padrões de distribuição de linfócitos T nas lesões cutâneas ativas têm sido descritos: CD4<sup>+</sup> > CD8<sup>+</sup> (Barral *et al.*, 1987; Pirmez *et al.*, 1990), CD4<sup>+</sup> = CD8<sup>+</sup> (Lima *et al.*, 1994) e CD4<sup>+</sup> < CD8<sup>+</sup> (Vieira *et al.*, 2002; Amato *et al.*, 2003), sugerindo uma heterogeneidade dos subtipos de células T nas lesões por *Leishmania*. A presença de

linfócitos T  $\gamma\delta$  também tem sido associada com a fase inicial da formação do granuloma. Acredita-se que estas células participem do reconhecimento antigênico e/ou da produção de citocinas no microambiente da lesão (Da-Cruz *et al.*, 2005; Gollob *et al.*, 2008). Já o influxo de células B tem sido associado à deposição de imunocomplexos que podem estar envolvidos na patogênese das lesões (Ridley *et al.*, 1984).

Na leishmaniose cutânea humana, a imunidade celular e a predominância de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 no plasma têm sido associadas à resposta do tipo 1, que atua no controle da infecção. O evento crucial para indução da resposta imune curativa contra a *Leishmania* é a eficiente ativação de linfócitos e monócitos capazes de produzir citocinas protetoras que levam à ativação de macrófagos, via IFN- $\gamma$ , resultando na síntese de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativo e, conseqüentemente, na morte dos parasitos intracelulares (Salaizo-Suazo *et al.*, 1999). Quanto ao perfil de citocinas, vários autores já demonstraram que há aumento da produção de IL-4 e IL-10, durante a fase inicial da infecção, sugerindo que essas citocinas estejam associadas à “down-regulation” da resposta do tipo 1, facilitando a proliferação do parasito (Coutinho *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 1999; Brelaz *et al.*, 2012; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012). Entretanto, tem sido descrito que, com a evolução da lesão, linfócitos T de pacientes portadores de LCL são capazes de produzir citocinas do tipo 1, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Assim, a LCL relaciona-se à resposta imunológica que favorece a cura (Brelaz *et al.*, 2012; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012). Portanto, acredita-se que uma resposta predominantemente inflamatória (tipo 1) responsável pela eliminação do parasito, mas modulada, seja importante para a resolução da infecção na LCL, evitando lesões teciduais extensas. Nesse sentido, tem sido demonstrada, em lesões de pacientes portadores de LCL, a presença de células T reguladoras, caracterizadas fenotipicamente como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, produtoras de grandes quantidades de IL-10 e TGF- $\beta$ . Campanelli *et al.* (2006) observaram que em cultura, estas células são capazes de inibir a proliferação de células T do sangue periférico, sugerindo ação imunorreguladora.

De acordo com alguns autores (Da-Cruz *et al.* 1994; Castellano *et al.* 2009; Reis *et al.* 2009; Brelaz *et al.*, 2012; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2012), na cura clínica após tratamento específico, observa-se produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e células NK que ativam macrófagos. Estas células produzem TNF- $\alpha$  que em sinergia com o IFN- $\gamma$  induzem ativação de iNOS e produção de NO, responsável pela destruição das formas amastigotas e eliminação do parasito (Giudice *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012).

A tendência à cura espontânea é relatada como uma característica desta forma clínica. Tem sido evidenciado que culturas de células de pacientes, estimuladas com antígeno de *Leishmania*, e que obtiveram a cura de forma espontânea, produzem TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Carvalho *et al.*, 1995; Brelaz *et al.*, 2012; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012). Entretanto, a observação de cura espontânea em estudos clínicos no Brasil é reduzida e não parece ser uma tendência da infecção pela *L. braziliensis* (Herwaldt & Bermam, 1992).

## **2. JUSTIFICATIVA**

## 2.JUSTIFICATIVA

O estabelecimento e a evolução das lesões causadas por infecção por *L. braziliensis* são altamente dependentes da imunidade celular. No entanto, o perfil de resposta imune associado à infecção em humanos ainda não está bem determinado. A possibilidade de se avaliar a interação *Leishmania*/monócitos e o seu impacto na expressão de marcadores de ativação, receptores envolvidos na interação/internalização do parasito, bem como na síntese de citocinas pelas células alvo do parasito, permitirá melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no estabelecimento bem como nos eventos associados à cura após tratamento específico da LCL.

Existem muitos métodos “*in vitro*” que descrevem a interação de fagócitos com *Leishmania*, principalmente aqueles derivados de estudos em modelos experimentais murinos, caninos e/ou linhagens celulares isoladas. Estas técnicas são baseadas na quantificação de parasitos no interior dos fagócitos, através de microscopia convencional, imunofluorescência e também citometria de fluxo ou através da utilização de marcadores radioativos com subsequente determinação de lise celular por cintilação. Entretanto, esses estudos não apresentaram nenhum relato de análise multiparamétrica, com foco na caracterização detalhada das alterações em marcadores de superfície e/ou intracelulares decorrentes do processo de interação/internalização do parasito. Recentemente nosso grupo estabeleceu um protocolo empregando um sistema de imunofenotipagem de plataforma multicromática, onde é possível avaliar o processo de fagocitose de formas promastigotas de *Leishmania* spp. por monócitos e estabelecer o perfil de citocinas e os níveis de óxido nítrico intracitoplasmáticos, produzidos pelos monócitos, envolvidos no direcionamento da resposta imune contra a *Leishmania* (Costa-Silva, 2013), que foi empregado no presente estudo. Diante do exposto, torna-se evidente que um estudo amplo incluindo avaliações de aspectos fenotípicos-funcionais de monócitos de pacientes portadores de LCL e após tratamento específico, consiste em uma abordagem relevante buscando contribuir para a melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro no contexto da LT.

### **3. OBJETIVO**

### **3.OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o perfil fenotípico-funcional de monócitos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada, tratados com o antimoniato de N-metil glucamina.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar a interação de monócitos do sangue periférico com formas promastigotas de *L. braziliensis*, antes e após tratamento.
2. Caracterizar aspectos fenotípicos de monócitos do sangue periférico, na ausência e presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*, através da avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular (TLR-2, TLR-4, CD16, CD32, CD64, IL-10R, IFN- $\gamma$ R, HLA-DR, CD80 e CD86), antes e após tratamento.
3. Caracterizar aspectos funcionais de monócitos do sangue periférico, na ausência e presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*, através da avaliação do perfil de citocinas intracelulares (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e TGF- $\beta$ ) e dos níveis de produção de óxido nítrico intracelular, antes e após tratamento.
4. Correlacionar aspectos fenotípicos-funcionais de monócitos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada, avaliados antes e após tratamento.
5. Correlacionar aspectos fenotípicos-funcionais de monócitos com o tempo de evolução e o tamanho das lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

O estudo seguiu a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que trata das diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos. O projeto proposto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram encaminhados para análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa René Rachou, e aprovados em 11 de agosto de 2008 (Parecer número 21/2008 – CEPSH – CPqRR).

### **4.2 Caracterização da população avaliada**

Foram incluídos 10 pacientes (Tabela 1) portadores de leishmaniose cutânea localizada, provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte/MG, atendidos no Centro de Referência em Leishmanioses, do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG, e 10 indivíduos saudáveis voluntários e doadores de sangue (idade entre 18 a 60 anos) provenientes do banco de sangue do Hospital Felício Rocho, como grupo controle (CS). Todos os pacientes receberam tratamento com antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®), conforme descrito no tópico “4.5 *Tratamento específico e critério de cura*”. Foram coletadas amostras de sangue venoso dos pacientes, sendo 5 mL-EDTA para realização do hemograma e 20 mL-Heparina sódica para realização de ensaios imunológicos em dois momentos, antes (LC T0) e 90 dias após o término do tratamento (LC T90), tempo preconizado pelo Ministério da saúde como prazo máximo para reepitelização total das lesões (MS, 2007).

**Tabela 1.** Caracterização da população avaliada.

Paciente	Idade	Gênero	Nº de lesões	Tempo da lesão (dias)	Diâmetro da lesão (mm)	Área total de lesão (mm <sup>2</sup> )
1	42	F	1	126	9,5 x 7,5	72
2	55	M	1	60	29,3 x 29,3	858,4
3	34	M	1	100	55 x 45,6	2508
4	23	M	1	150	69,5 x 46	3197
5	22	F	6	44	12,4 x 10,9 *	871,3 **
6	28	M	1	60	22,6 x 19,4	438,4
7	42	M	6	150	19,75 x 18,6 *	3285,9 **
8	27	F	1	60	23,7 x 14,1	334,1
9	51	M	1	120	64,5 x 31,1	2005,9
10	18	M	1	90	21,8 x 17,1	372,7
Média	34	-	-	96	32,8 x 23,9	1389,8

\* Diâmetro médio das seis lesões.

\*\*A área total da lesão foi calculada a partir do diâmetro da lesão. Em pacientes com mais de uma lesão, a área de cada lesão foi calculada separadamente e foram somadas para obter a área total da lesão (mm<sup>2</sup>).

#### 4.3 Critérios de inclusão

Foram convidados a participar do estudo pacientes adultos (maiores de 18 e menores de 60 anos de idade), encaminhados ao Centro de Referência em Leishmanioses (CRL) do Centro de Pesquisas René Rachou (CpqRR) apresentando lesões cutâneas típicas de leishmaniose, e diagnóstico de LCL confirmado por critérios clínicos, epidemiológicos e exame parasitológico (“imprint” ou cultivo) positivo.

#### 4.4 Critérios de exclusão

Não foram incluídos neste estudo pacientes portadores de doenças sistêmicas concomitantes, que sabidamente interferem na capacidade imunológica do indivíduo; uso de medicação tópica sobre a lesão cutânea e uso prévio de leishmanicidas; contra-indicação para o uso do Glucantime® na dose e esquema terapêutico recomendados pelo Ministério da Saúde. Pacientes com resposta negativa à Intradermo Reação de Montenegro (IDRM) também foram excluídos, visando incluir pacientes que apresentam evidência de resposta imune celular preservada.

## **4.5 Tratamento específico e critério de cura**

O tratamento e critério de cura adotados foram os propostos pelo Ministério da Saúde. A cura é apenas clínica e indica-se o acompanhamento regular por 12 meses. Deste modo, a cura é definida pela reepitelização das lesões ulceradas, regressão total da infiltração e eritema, até três meses após a conclusão do esquema terapêutico. Entretanto, nos casos com evidência de cicatrização progressiva das lesões sem cumprir completamente os critérios acima, sugere-se o prolongamento da observação até seis meses (MS, 2007). Os pacientes do estudo foram atendidos no Centro de Referência em Leishmanioses do CPqRR e tratados, segundo as recomendações do Ministério da Saúde, com 20 mg/Kg de antimônio (Glucantime®) por dia, durante 20 dias, por via intramuscular. Os pacientes foram acompanhados clinicamente e através de exames laboratoriais (dosagens bioquímicas para avaliação de função renal, hepática, pancreática; hemograma e eletrocardiograma) durante o tratamento e até 12 meses após o final do tratamento específico, porém, avaliamos somente antes e 90 dias após o término do tratamento. Não houve recidiva nem falha terapêutica no grupo de pacientes inseridos no estudo.

## **4.6 Exames laboratoriais**

### *4.6.1 Teste imunológico*

Os pacientes incluídos no estudo foram submetidos ao teste imunológico através da Intradermo Reação de Montenegro, realizada conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (MS, 2007). O método se fundamenta na inoculação do antígeno por via intradérmica e visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada. O antígeno empregado é produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos do Centro de Pesquisas de Saúde do Paraná, utilizando *L. amazonensis*, cepa de referência MHOM/BR/73/M2269 onde cada mL do produto contém 40 µg de nitrogênio protéico. Após antissepsia, foi aplicado o volume de 0,1 mL na derme, utilizando agulha modelo 13 x 3,3 na face volar do antebraço. O resultado foi considerado positivo quando se observou endurecimento igual ou maior a 0,5 cm de diâmetro, 48 horas após a aplicação.

#### 4.6.2 Teste parasitológico

Os pacientes incluídos no estudo foram submetidos ao exame parasitológico direto (“imprint”) e indireto (cultura de aspirado da lesão). Para obtenção das amostras foram realizados procedimentos de biópsia das lesões cutâneas. A análise do “imprint” foi realizada conforme protocolo do CRL-CpqRR/ FIOCRUZ – MG, fundamentado nas orientações do Ministério da Saúde (MS, 2007). A obtenção dos aspirados bem como o cultivo do material, foram realizados segundo procedimentos padronizados no CRL-CpqRR/ FIOCRUZ – MG. A biópsia trata-se de um procedimento médico e sua realização tem risco mínimo para o paciente. Após antissepsia e aplicação de degermante na lesão e pele circunjacente, a lesão foi lavada com solução salina estéril 0,9%, seguida de aplicação de iodo-povidine. Foi realizada a anestesia local com cloridrato de lidocaína 2%. O fragmento da borda da lesão foi retirado com instrumento cirúrgico cortante circular de 6 mm (“punch”), direcionado à camada mais profunda da derme. Em seguida, o excesso de sangue foi retirado com papel de filtro estéril e o fragmento dividido em duas partes. Uma parte do material foi aplicada sobre a superfície de três lâminas para microscopia (“imprint”).

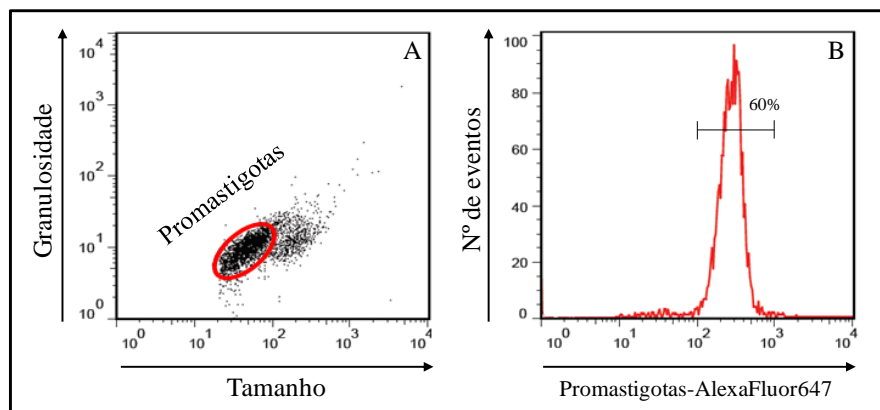
Após a fixação do material aderido às lâminas de vidro por aposição (“imprint”), o espécime foi corado pelo método de Giemsa e observado ao microscópio óptico, em objetiva de imersão. O resultado foi considerado positivo quando foram visualizadas formas amastigotas de *Leishmania* spp. no interior ou não de células fagocitárias.

Os aspirados foram obtidos utilizando-se sistema a vácuo, segundo a técnica de Romero *et al.* (1999), com pequenas modificações. Para o cultivo dos aspirados, utilizou-se tubos de vidro com tampa de borracha (Vacutainer<sup>®</sup>) com capacidade para 10 mL. Aos tubos foi adicionado meio de cultura bifásico composto de uma fase sólida de agar acrescido de 10% de sangue de coelho desfibrinado e, uma fase líquida de 200 µL de solução salina (0,9%), adicionado de 25 µg/mL de gentamicina. Os tubos foram tampados com tampa de borracha e o vácuo restituído por aspiração de ar por duas vezes utilizando seringa de 20 mL. A técnica consiste em puncionar a pele sadia adjacente à lesão, após anestesia e antissepsia, e dirigir a agulha em direção à área inflamada da lesão. Após procedimento de rotação da agulha, retirou-se o sistema permitindo que o ar do ambiente penetrasse no tubo e deslocasse os pequenos fragmentos de tecido cortados pelo bisel da agulha para o meio de cultivo. Para cada paciente foram utilizados três tubos. Após a coleta do material, os tubos foram mantidos em estufa incubadora B.O.D. à 26°C por até 21 dias. A leitura das culturas foi realizada aos 4, 7, 14 e 21 dias. No momento das leituras, os tubos foram agitados suavemente para

homogeneizar a suspensão e, aproximadamente 10 µL da cultura foram colocados entre lâmina e lamínula (22 x 22 mm) e examinados ao microscópio óptico com aumento de 40 vezes. Foi considerado resultado positivo quando formas promastigotas foram encontradas no material examinado. O resultado foi considerado negativo quando após 21 dias de repetidas leituras, não se observou crescimento do parasito.

#### **4.7 Obtenção e marcação de formas promastigotas de *L. braziliensis***

As formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1986/MSS), foram obtidas a partir de cultivos em meio bifásico contendo NNN e meio líquido complexo LIT (“liver infusion tryptose”) suplementado com 20% de SFB (soro fetal bovino), por 7 dias (fase estacionária de crescimento), a temperatura de 26°C. Os parasitos foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno de 50 mL, e a suspensão foi submetida à centrifugação 10 x g, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Os parasitos foram recuperados após um período de repouso de 30 minutos em estufa B.O.D a 26°C, coletando-se o sobrenadante que foi transferido para outro tubo, sendo o sedimento desprezado. Em seguida, os parasitos foram lavados por centrifugação a 480 x g, durante 10 minutos a 4°C com 20 mL de PBS (“phosphate buffered saline”) 10% SFB pH 7,2. O sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de PBS 10% SFB pH 7,2. Os parasitos foram contados e a suspensão ajustada para o número necessário para os ensaios de fagocitose ( $10^8$  parasitos/mL). Para a marcação das formas promastigotas de *Leishmania*, quantidades equivalentes de parasitos e da preparação do fluorocromo AlexaFlúor 647 (1 mL de parasitos na concentração de  $10^8$  parasitos/mL + 1 mL de AlexaFlúor 647 na concentração de 3,2 µg/mL) foram incubados por 30 minutos a 37°C em estufa 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação, estes foram lavados por centrifugação a 480 x g, durante 10 minutos a 18°C com PBS 0,015M, pH 7,4 – PBS 1x e ressuspensionados com PBS 1x para um volume adequado de parasitos (1 parasito/ 2 células). Uma alíquota foi separada para avaliação no citômetro de fluxo a fim de avaliar a intensidade de fluorescência apresentada pelos parasitos marcados com a preparação de AlexaFlúor 647. A qualidade da marcação foi avaliada através da intensidade média de fluorescência (IMF) entre  $10^2$  e  $10^3$  apresentada pela maioria (no mínimo 60%) dos parasitos marcados (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo da seleção e marcação de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*. A Figura “A” representa o perfil de promastigotas de *L. braziliensis*, selecionadas no gate “Promastigotas” em gráfico de distribuição pontual de tamanho *versus* granulosidade. A Figura “B” representa a intensidade média de fluorescência apresentada pelos parasitos após a marcação com Alexa Fluor 647 em gráfico de histograma.

#### 4.8 Avaliação da interação monócito-*Leishmania*, do perfil de expressão de marcadores de superfície celular e de citocinas intracelulares de monócitos

Para o ensaio de interação de monócitos do sangue periférico humano com formas promastigotas de *L. braziliensis*, foi utilizado o protocolo descrito por GOMES *et al.*, (2012), adaptado.

A fim de evitar a interferência de anticorpos e proteínas do complemento, ambos importantes para a internalização da *Leishmania*, leucócitos do sangue periférico ( $10^7$  células/mL) na ausência do plasma autólogo foram incubados com os parasitos numa relação de 1 parasito/ 2 células por 1 hora, em tubos de polipropileno de 14 mL contendo 1 mL de PBS 3% SFB, em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Foram realizadas culturas nas mesmas condições descritas acima, sem parasitos (cultura controle). Após incubação, Brefeldina A - BFA (10 µg/mL) foi adicionada às culturas que foram re-incubadas por mais 4 horas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, EDTA (2 mM) foi adicionado e as culturas foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente.

Para avaliação do perfil de marcadores de superfície celular, após incubação, 200 µL (1.000.000 de leucócitos) das culturas foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL contendo 3 µL de anti-CD14PerCP e 2 µL de anticorpo anti-superfície (IL-10R, IFN-γR, TLR-2, TLR-4, HLA-DR, CD-16, CD-32, CD-64, CD-80 e CD-86 conjugados ao fluorocromo PE – Tabela 2) e incubados por 20 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foram adicionados 3 mL de solução de lise comercial (FACS Lysing Solution – BD Biosciences) no vórtex e as células foram incubadas por 10 minutos ao abrigo da luz. Os

tubos foram submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram vertidos, a suspensão celular ressuspensa em 2 mL de PBS 1x e os tubos submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Novamente, os tubos foram vertidos, a suspensão celular ressuspensa e um volume de 200 µL de solução fixadora (10 g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) foi adicionado em cada tubo. Após 15 minutos a 4°C, 3.000 monócitos foram adquiridos e a análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos determinados com o auxílio do citômetro de fluxo FACScalibur – BD. Para a análise dos dados foi utilizado o software FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 7.6.1).

**Tabela 2.** Anticorpos utilizados para avaliação da expressão de marcadores de superfície celular.

<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Função</b>
Anti-CD14	PerCP	MØP9	Receptor para complexo de lipopolissacarídeo e proteína ligadora de lipopolissacarídeo.
Anti-TLR-2	PE	TL2.1	Receptor envolvido no reconhecimento de patógenos e ativação da resposta imune inata.
Anti-TLR-4	PE	HTA125	Receptor envolvido no reconhecimento de patógenos e ativação da resposta imune inata.
Anti-CD16	PE	3G8	Receptor de baixa afinidade para IgG.
Anti-CD32	PE	3D3	Receptor Fc de média afinidade para imunoglobulinas agregadas:

			complexos imunes.
Anti-CD64	PE	10.1	Receptor de alta afinidade para IgG. Mede a fagocitose, a captura do antígeno e a ADCC.
Anti-IFN- $\gamma$ R (CD119)	PE	GIR-208	Receptor da citocina IFN- $\gamma$ .
Anti-IL-10R (CD210)	PE	3F9	Receptor da citocina IL-10.
Anti-HLA-DR	PE	G46-6	Molécula de MHC de classe II, participa da ativação celular.
Anti-CD80	PE	L307.4	Co-regulação de ativação de linfócitos T.
Anti-CD86	PE	2331 (FUN-1)	Co-regulação de ativação de linfócitos T.

Para avaliação do perfil de citocinas intracelulares, após incubação, 500  $\mu$ L (2.500.000 leucócitos) das culturas foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL contendo 6  $\mu$ L de anti-CD14PerCP e re-incubados por 20 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foram adicionados 3 mL de solução de lise comercial (FACS Lysing Solution – BD Biosciences) de hemácias no vórtex e as células foram incubadas por 10 minutos ao abrigo da luz. Os tubos foram submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram vertidos, a suspensão celular ressuspensa em 500  $\mu$ L de PBS 1x contendo 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica – PBS-W gelado e 3 mL de PBS-W contendo 0,5% de saponina – PBS-P gelado e os tubos submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Os tubos foram vertidos, a suspensão celular ressuspensa em 3 mL de PBS-W gelado e novamente submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. A suspensão



celular foi ressuspensa em 250  $\mu$ L (aproximadamente 5.000.000 leucócitos, ou seja, 20.000 células/ $\mu$ L) de PBS-W e 30  $\mu$ L (aproximadamente 600.000 leucócitos) foram transferidos para placas de fundo em U de 96 poços contendo 20  $\mu$ L de anticorpo anti-citocinas previamente diluídas em PBS-P (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e TGF- $\beta$  - Tabela 3) e, em seguida, incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, foram adicionados 100  $\mu$ L de PBS-P gelado/poço e a placa foi submetida à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Em seguida, a placa foi vertida, as células ressuspensas e foram adicionados 200  $\mu$ L de PBS-W gelado/poço. A placa foi centrifugada novamente a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Após centrifugação, a placa foi vertida, a suspensão celular ressuspensa e um volume de 200  $\mu$ L de solução fixadora gelada foi adicionado por poço. Após 15 minutos a 4°C, 3.000 monócitos foram adquiridos e a análise dos parâmetros morfométricos, fenotípicos e funcionais foi determinada com o auxílio do citômetro de fluxo FACScalibur – BD. Para a análise dos dados foi utilizado o software FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 7.6.1.).

**Tabela 3.** Anticorpos utilizados para avaliação da produção de citocinas intracelulares.

<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Função</b>
Anti-TNF- $\alpha$	PE	Mab11	Inflamação local, ativação endotelial.
Anti-IL-12	PE	C11.5	Ativa células NK, induz a diferenciação de células T CD4 em células Tipo 1.
Anti-IL-10	PE	JES3-9D7	Potente supressor das funções dos macrófagos.
Anti-TGF- $\beta$	PE	TB21	Inibe crescimento celular, antiinflamatório, induz mudança para produção de IgA.

É importante ressaltar que os resultados só foram considerados válidos nas análises em que foi observada uma leitura de 3.000 monócitos/tubo e no mínimo 200 monócitos expressando determinado marcador de superfície celular, citocina ou NO.

#### 4.9 Avaliação da produção de óxido nítrico

Kojima *et al.* desenvolveram em 1998, um reagente permeável à membrana celular que permite a determinação dos níveis de NO intracelular por citometria de fluxo, denominado diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2 DA). A determinação do NO intracelular por citometria de fluxo baseia-se na capacidade do NO de oxidar o reagente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), que não é fluorescente para uma forma fluorescente. Assim, resumidamente, o DAF-2 DA é convertido a 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) por meio da ação de esterases intracelulares. O DAF-2 não é permeável à membrana celular permanecendo, portanto, no interior das células. Em pH fisiológico, o DAF-2 é relativamente não fluorescente. No entanto, na presença de NO e oxigênio, um produto fluorescente é formado, o triazolofluoresceína (DAF-2T). A medida da fluorescência é feita pela leitura da amostra no citômetro de fluxo e é proporcional à concentração de NO nas células (Havenga *et al.*, 2001; Strijdom *et al.*, 2004; Schachnik *et al.* 2008).

Leucócitos do sangue periférico (100 µL – 1.000.000 células) foram incubados com os parasitos (5 µL – 500.000 parasitos) numa relação de 1 parasito/2 células por 1 hora sob agitação, em tubos de polipropileno de 5 mL, estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Foram incluídos ainda: 30 µL de PBS 1x 10% SFB + 100 µL da cultura (controle de células); 10 µL de PBS 1x 10% SFB + 20 µL de DAF-2/DA (4,5-diamino-fluorescein diacetate) 10 µM + 100 µL da cultura (controle negativo); 10 µL de aminoguanidina – AG 1 M + 20 µL de DAF-2/DA 10 µM + 100 µL da cultura (controle de especificidade); 10 µL de LPS 100 µg/mL + 10 µL de DAF-2/DA 10 µM + 100 µL da cultura (controle positivo). As culturas foram incubadas por mais 3 horas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> na presença de DAF-2DA. Após incubação, os tubos foram transferidos para o gelo, e as culturas transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL contendo 3 µL de anticorpo anti-CD14PerCP seguindo nova incubação por 20 minutos ao abrigo da luz. Foram adicionados 2 mL de solução de lise comercial (FACS Lysing Solution – BD Biosciences) no vórtex e as células foram incubadas por 10 minutos ao abrigo da luz. Foi adicionado 1 mL de PBS 1x gelado aos tubos e estes foram submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram vertidos, a suspensão celular ressuspendida e lavada com 2 mL de PBS 1x gelado a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Após

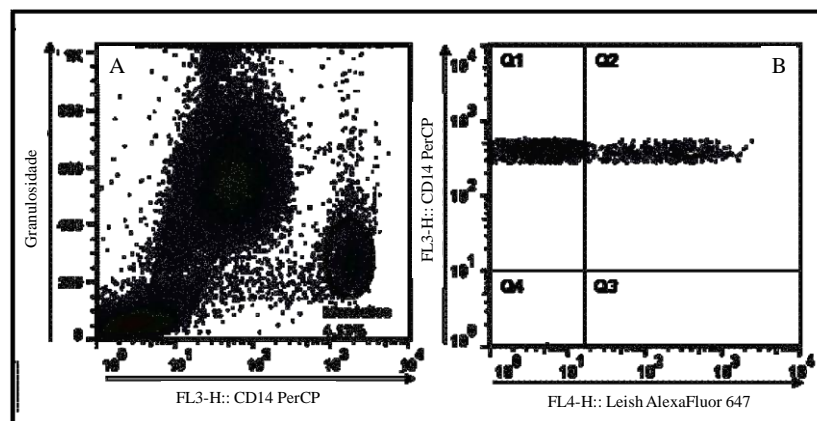
lavagem, os tubos foram vertidos novamente e a suspensão celular ressuspendida em 150  $\mu$ L de solução fixadora. Para aquisição dos dados, 3.000 eventos/ “gate” de monócitos foram obtidos usando citômetro de fluxo FACScalibur – BD. Para análise dos dados, foi utilizado o software FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 7.6.1.).

#### 4.10 Análise dos dados

##### 4.10.1 Estratégias de análise da interação monócito-*Leishmania* e do perfil fenotípico-funcional de monócitos do sangue periférico

Para alcançar os objetivos propostos de avaliação do perfil fenotípico-funcional de monócitos do sangue periférico, duas diferentes estratégias de análise foram empregadas.

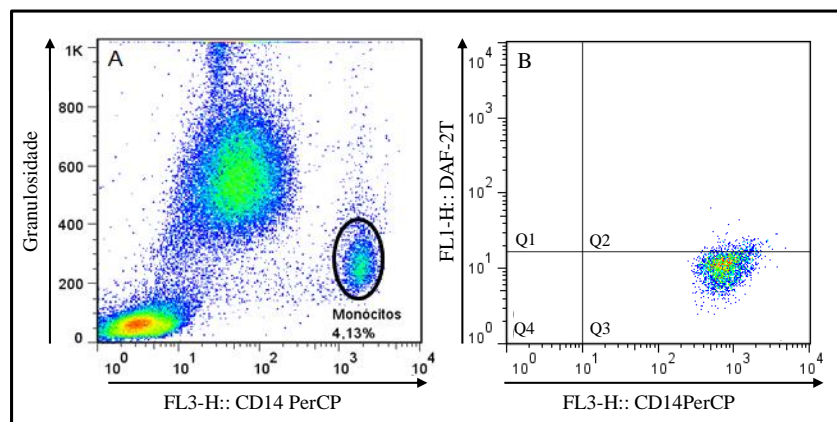
Inicialmente, monócitos foram identificados e selecionados por uma janela - “gate”, em gráficos de densidade de fluorescência-3 (FL3-H, CD14 PerCP) *versus* granulosidade celular (Side Scatter - SSC) (Figura 2A). Após seleção da população de interesse foi possível avaliar o percentual de monócitos que interagiram com formas promastigotas de *L. braziliensis*, em gráfico de densidade de fluorescência-4 (FL4-H, Leish Alexa Fluor 647) *versus* fluorescência-3 (FL3-H, CD14 PerCP), representado na figura 2B.



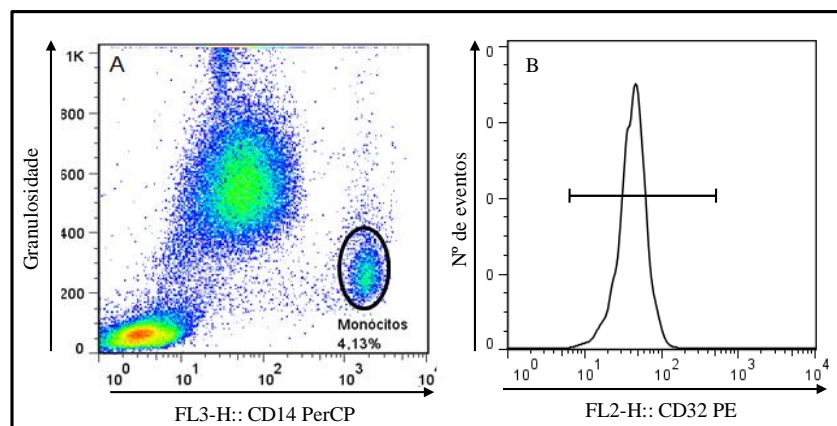
**Figura 2.** Análise representativa da interação monócito-*Leishmania* por citometria de fluxo. A figura “A” representa o perfil da população de monócitos, selecionados no gate “Monócitos” em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14 PerCP) *versus* granulosidade (SSC). A figura “B” representa o perfil de análise da população de monócitos na presença de formas promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com Alexa Fluor 647, em gráfico de densidade de fluorescência-4 (Leish Alexa Fluor 647) *versus* fluorescência-3 (CD14 PerCP). Monócitos que interagiram com o parasito estão representados no quadrante duplo positivo (Q2).

A próxima estratégia correspondeu à avaliação do perfil fenotípico-funcional de monócitos. Moléculas expressas constitutivamente (TLR-2, TLR-4, CD16, CD32, CD64,

IFN- $\gamma$ R, HLA-DRe CD86) em monócitos foram analisadas por intensidade média de fluorescência (IMF) em gráfico de histograma (Figura 4), enquanto as moléculas de produção/expressão induzida (IL-10R, CD80, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e TGF- $\beta$ ) foram analisadas por percentual de células produtoras (Figura 3). Assim como na estratégia anterior, monócitos foram identificados e selecionados por uma janela - “gate”, em gráficos de densidade de fluorescência-3 (FL3-H, CD14PerCP) versus granulocidade celular (Side Scatter - SSC). Após seleção da população de interesse foi possível analisar a produção/expressão de biomarcadores induzidos em monócitos do sangue periférico (Figura 3).



**Figura 3.** Análise do perfil fenotípico-funcional por monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. A figura “A” representa o perfil da população de monócitos, selecionados no gate “Monócitos” em gráfico de densidade de fluorescência-3 (FL3-H, CD14 PerCP) versus granulocidade (SSC). A figura “B” representa perfil de análise da produção de NO por monócitos do sangue periférico por percentual em gráfico de densidade de fluorescência-1 (FL1-H, DAF-2T) versus densidade de fluorescência-3 (FL3-H, CD14 PerCP). Monócitos produtores de NO estão representados no quadrante duplo-positivo (Q2).



**Figura 4.** Análise do perfil fenotípico-funcional por monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. A figura “A” representa o perfil da população de monócitos, selecionados no gate “Monócitos” em gráfico de

densidade de fluorescência-3 (FL3-H, CD14 PerCP) *versus* granulocidade (SSC). A figura “B” representa perfil de análise da expressão de CD32 por monócitos do sangue periférico, por intensidade média de fluorescência.

#### 4.10.2 Análises de redes de correlações

As redes de interações entre as biomoléculas (Shannon, Owen, Ozier, *et al.*, 2003) foram construídas no software Cytoscape (versão 2.8.2), para avaliar a associação entre a expressão de marcadores de superfície, produção de óxido nítrico e a produção de citocinas, para o grupo controle e grupo dos pacientes avaliados antes e noventa dias após o término do tratamento. Para construção das redes de interações, foram usados como referência, os resultados das análises de correlação entre os biomarcadores avaliados no estudo.

#### 4.11 Análise estatística dos dados

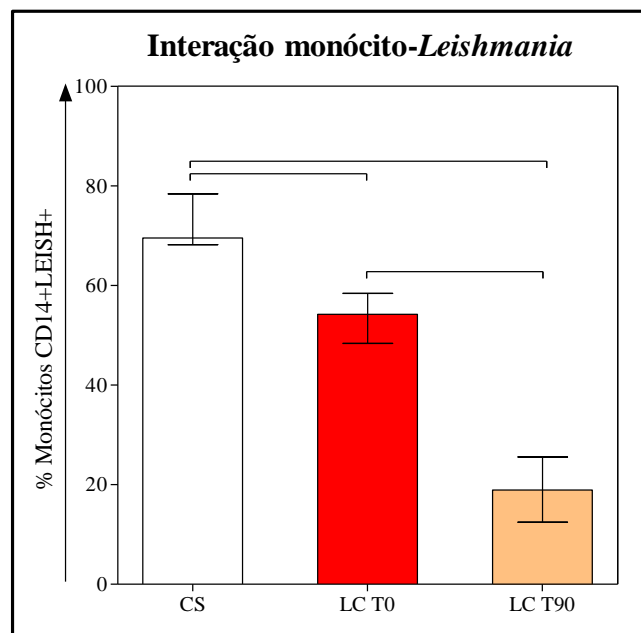
As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0.0 (San Diego, CA). Os dados apresentaram distribuição não paramétrica, dessa forma, para análise comparativa entre 3 grupos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Para análise comparativa entre dois grupos, foi empregado o teste não paramétrico Mann-Witney. O teste de correlação de Spearman foi realizado para avaliar a associação entre os biomarcadores. O índice de correlação ( $r$ ) foi utilizado para caracterizar a força de correlação como negativa ( $r < 0$ ), correlação positiva fraca ( $0 > r < 0,36$ ), positiva moderada ( $0,37 > r < 0,67$ ) e positiva forte ( $r > 0,68$ ), conforme proposto por Taylor (1990). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## **5.RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da interação monócito-*Leishmania* de pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada, avaliados antes e após tratamento.

A Figura 5 representa a análise da interação de formas promastigotas de *L. braziliensis* com monócitos do sangue periférico de indivíduos do grupo controle constituído por indivíduos saudáveis doadores de sangue (controle saudável – CS) e pacientes portadores de LCL antes do tratamento (LC T0), e 90 dias após o tratamento (LC T90) através da avaliação do percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>Leish<sup>+</sup> (*L. braziliensis* marcada com Alexa Flúor 647). Os dados demonstraram menor interação monócito-*Leishmania* nos grupos LC T0 ( $p = 0,0010$ ) e LC T90 ( $p < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo controle, e menor interação monócito-*Leishmania* no grupo LC T90 ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo LC T0.



**Figura 5.** Avaliação da taxa de interação de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* com monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS,  $n = 10$ ), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0,  $n = 10$ ) e 90 dias após o tratamento (LC T90,  $n = 10$ ). Os resultados estão apresentados como percentual de células CD14<sup>+</sup>Leish<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CS, LC T0 e LC T90 estão representadas pelas linhas conectoras.

Após avaliação da interação monócito-*Leishmania*, foi de nosso interesse caracterizar o perfil fenotípico-funcional dessas células em culturas de produção basal, ou seja, na

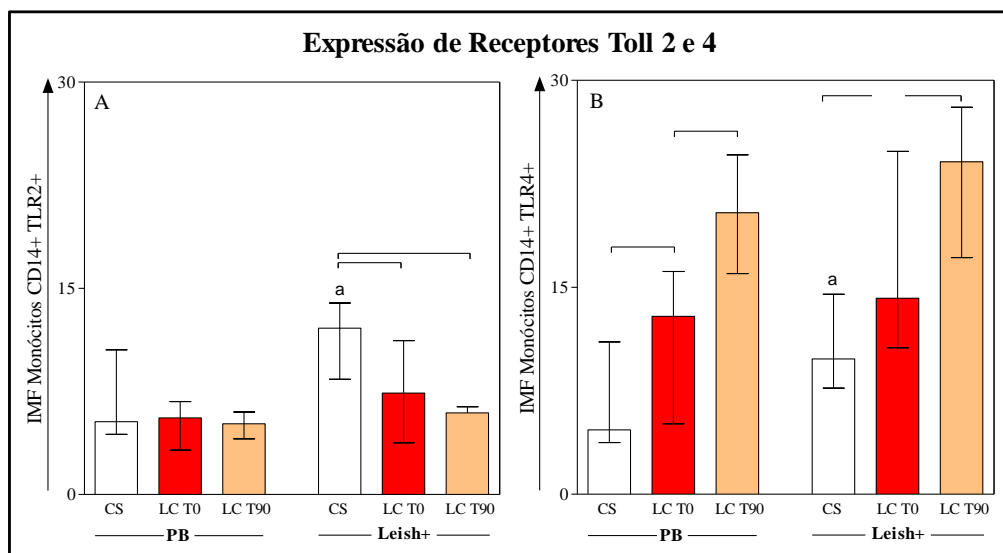
ausência de formas promastigotas de *L. braziliensis* e culturas com formas promastigotas de *L. braziliensis*, a fim de verificar se existe influência direta do parasito no perfil fenotípico-funcional dessas células em pacientes portadores de LCL (LC T0) e tratados apresentando total reepitelização das lesões (LC T90).

## 5.2 Caracterização dos aspectos fenotípicos de monócitos do sangue periférico.

### 5.2.1 Avaliação da expressão de receptores Toll 2 e 4

A Figura 6 representa a análise do perfil de expressão dos receptores Toll 2 (TLR-2) e 4 (TLR-4), por monócitos do sangue periférico.

Os dados demonstraram menor expressão de TLR-2 nos grupos LC T0 ( $p = 0,0279$ ) e LC T90 ( $p < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo CS, em culturas Leish<sup>+</sup>. Foi observado maior expressão de TLR-2 ( $p = 0,0147$ ) e TLR-4 ( $p = 0,0288$ ) em culturas Leish<sup>+</sup> quando comparadas as culturas PB, no grupo CS. Em culturas PB, foi observada maior expressão de TLR-4 no grupo LC T0 ( $p = 0,0130$ ) quando comparado ao grupo CS, e maior expressão de TLR-4 no grupo LC T90 ( $p = 0,0054$ ) em relação ao grupo LC T0. Já em culturas Leish<sup>+</sup> foi observada maior expressão de TLR-4 no grupo LC T90 ( $p = 0,0057$ ) quando comparado ao grupo CS.



**Figura 6.** Avaliação do perfil de expressão de TLR-2 (Figura 6A) e TLR-4 (Figura 6B) em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS,  $n = 10$ ), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0,  $n = 10$ ) e 90 dias após o tratamento (LC T90,  $n = 10$ ). Os resultados estão apresentados como intensidade média de fluorescência (IMF) de monócitos CD14<sup>+</sup>TLR<sup>+</sup> em

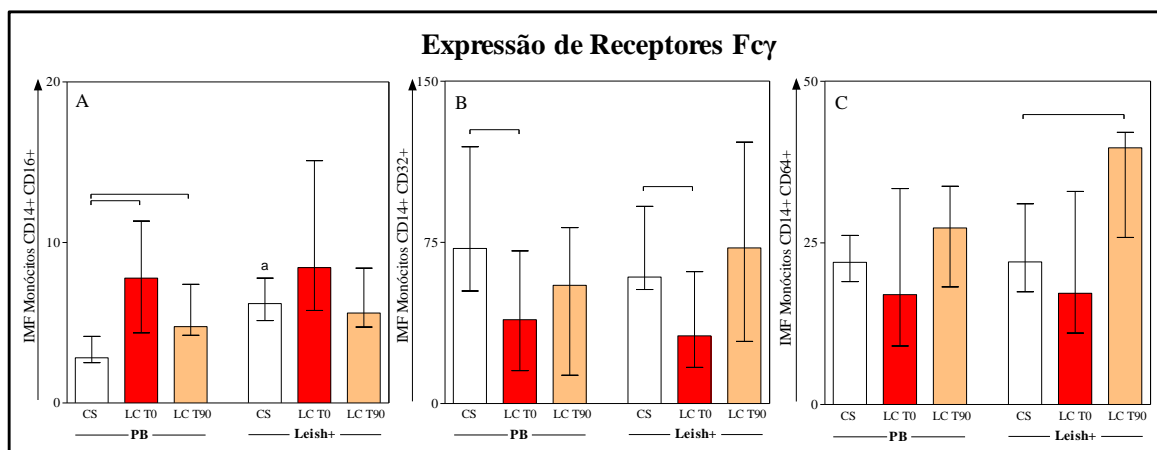


formato de gráficos de barras que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CS, LC T0 e LC T90 estão representadas pelas linhas conectoras. Já as diferenças estatisticamente significativas entre a cultura de produção basal (PB) e a cultura estimulada (Leish<sup>+</sup>) do grupo CS estão representadas pela letra a.

### 5.2.2 Avaliação da expressão de receptores Fcγ: CD16, CD32 e CD64

A avaliação da expressão de receptores de baixa, média e alta afinidade para IgG, CD16, CD32 e CD64 respectivamente, em monócitos do sangue periférico está representada na Figura 7.

Os dados demonstraram maior expressão de CD16 nos grupos LC T0 ( $p = 0,0025$ ) e LC T90 ( $p = 0,0047$ ) quando comparados ao grupo CS em culturas PB. Foi observada maior expressão de CD16 ( $p = 0,0006$ ) em culturas Leish<sup>+</sup> quando comparada à cultura PB, no grupo CS. Além disso, foi observada menor expressão de CD32 no grupo LC T0 em relação ao grupo CS, tanto em culturas PB ( $p = 0,0266$ ) quanto em culturas Leish<sup>+</sup> ( $p = 0,0343$ ). Foi observada ainda, maior expressão de CD64 no grupo LC T90 ( $p = 0,0220$ ) quando comparado ao grupo CS, em culturas Leish<sup>+</sup>.

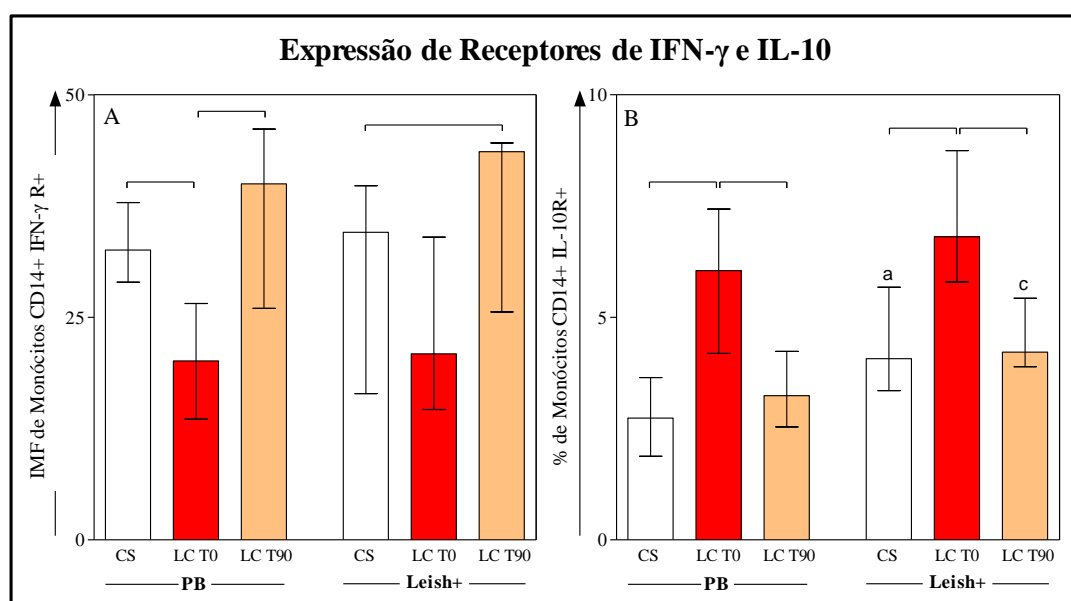


**Figura 7.** Avaliação do perfil de expressão de receptores Fcγ CD16 (Figura 7A), CD32 (Figura 7B) e CD64 (Figura 7C) em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish<sup>+</sup>). Os resultados estão apresentados como intensidade média de fluorescência (IMF) de monócitos CD14<sup>+</sup>FcγR<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CS, LC T0 e LC T90 estão representadas pelas linhas conectoras. Já as diferenças estatisticamente significativas entre a cultura de produção basal (PB) e a cultura estimulada (Leish<sup>+</sup>) do grupo CS estão representadas pela letra a.

### 5.2.3 Avaliação da expressão dos receptores de IFN- $\gamma$ e IL-10

A avaliação da expressão de receptores das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em monócitos do sangue periférico está representada na Figura 8.

Foi observada menor expressão de IFN- $\gamma$ R no grupo LC T0 quando comparado aos grupos CS ( $p = 0,0256$ ) e LC T90 ( $p = 0,0106$ ), em culturas PB. Em culturas Leish<sup>+</sup> foi observada maior expressão de IFN- $\gamma$ R no grupo LC T90 ( $p = 0,0327$ ) quando comparado ao grupo CS. Foi observado maior percentual de monócitos IL-10R<sup>+</sup> no grupo LC T0 quando comparado aos grupos CS e LC T90 tanto em culturas PB ( $p = 0,0256$ ;  $p = 0,0142$ ) quanto em culturas Leish<sup>+</sup> ( $p = 0,0360$ ;  $p = 0,0078$ ). Os dados demonstraram ainda, maior percentual de monócitos IL-10R<sup>+</sup> em culturas Leish<sup>+</sup> quando comparadas as culturas PB, nos grupos CS ( $p = 0,0411$ ) e LC T90 ( $p = 0,0403$ ).

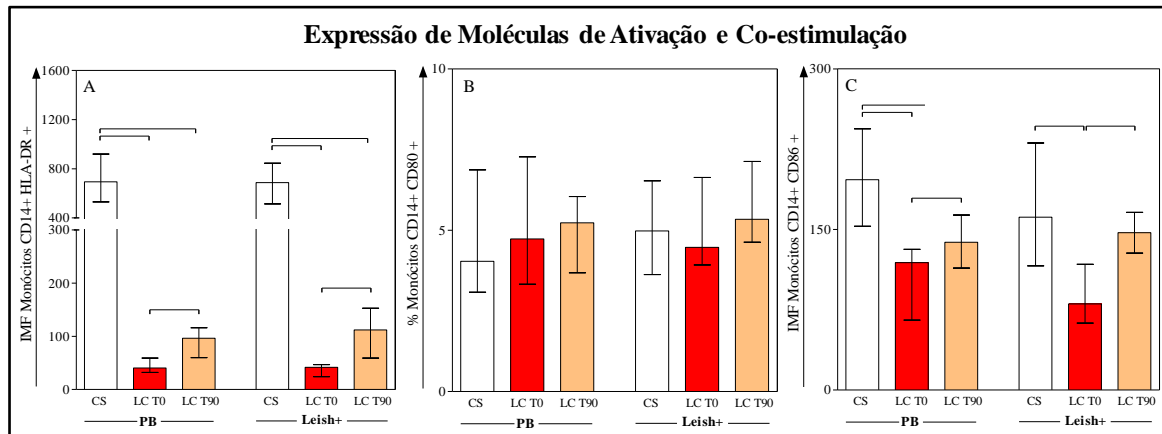


**Figura 8.** Avaliação do perfil de expressão de receptores de IFN- $\gamma$  (Figura 8A), e IL-10 (Figura 8B) em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS,  $n = 10$ ), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0,  $n = 10$ ) e 90 dias após o tratamento (LC T90,  $n = 10$ ), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish<sup>+</sup>). Os resultados estão apresentados como intensidade média de fluorescência (IMF) de monócitos CD14<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ R<sup>+</sup> e como percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>IL-10R<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CS, LC T0 e LC T90 estão representadas pelas linhas conectoras. Já as diferenças estatisticamente significativas entre a cultura de produção basal (PB) e a cultura estimulada (Leish<sup>+</sup>) dos grupos CS e LC T90 estão representadas pelas letras a e c respectivamente.

#### 5.2.4 Avaliação da expressão da molécula de ativação HLA-DR e dos co-estimuladores CD80 e CD86 em monócitos do sangue periférico

A Figura 9 representa a análise do perfil de expressão da molécula de ativação HLA-DR e das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 em monócitos do sangue periférico.

Os dados demonstraram menor expressão de HLA-DR nos grupos LC T0 ( $p < 0,0001$ ) e LC T90 ( $p < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo CS, e menor expressão de HLA-DR no grupo LC T0 em relação ao grupo LC T90, tanto em culturas PB ( $p = 0,0142$ ) quanto em culturas Leish<sup>+</sup> ( $p = 0,0188$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados quanto ao percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>. Foi observada menor expressão de CD86 nos grupos LC T0 ( $p = 0,0013$ ) e LC T90 ( $p = 0,0133$ ) quando comparados ao grupo CS, e menor expressão de CD86 no grupo LC T0 ( $p = 0,0063$ ) em relação ao grupo LC T90 em culturas PB. Em culturas Leish<sup>+</sup> foi observada menor expressão de CD86 no grupo LC T0 quando comparado aos grupos CS ( $p = 0,0017$ ) e LC T90 ( $p = 0,0056$ ).

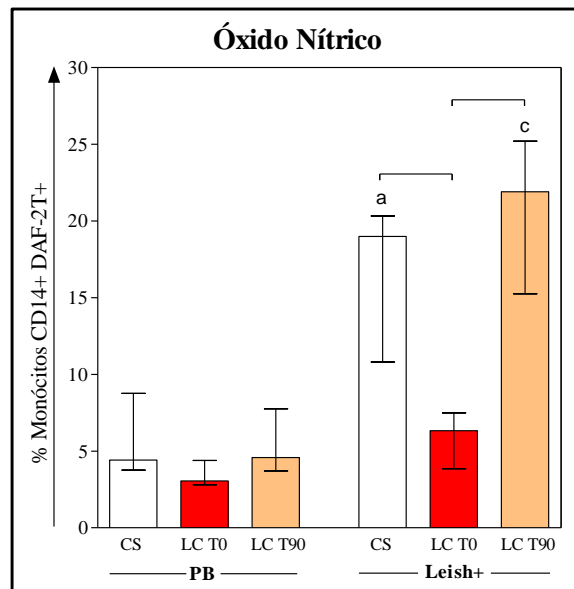


**Figura 9.** Avaliação do perfil de expressão da molécula de ativação HLA-DR (Figura 9A), e das moléculas de co-estimulação CD80 (Figura 9B) e CD86 (Figura 9C) em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS,  $n = 10$ ), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0,  $n = 10$ ) e 90 dias após o tratamento (LC T90,  $n = 10$ ), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish<sup>+</sup>). Os resultados estão apresentados como intensidade média de fluorescência (IMF) de monócitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> e como percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CS, LC T0 e LC T90 estão representadas pelas linhas conectoras.

### 5.3 Caracterização do perfil de produção de óxido nítrico intracelular por monócitos do sangue periférico.

A análise dos níveis de NO intracelular em monócitos do sangue periférico está representada na Figura 10.

Foi observada menor produção de NO intracelular por monócitos do grupo LC T0 em relação aos grupos CS ( $p = 0,0003$ ) e LC T90 ( $p < 0,0001$ ), em culturas Leish<sup>+</sup>. Os dados também demonstraram maior produção de NO em culturas estimuladas quando comparadas as culturas PB, nos grupos CS ( $p = 0,0002$ ) e LC T90 ( $p < 0,0001$ ).



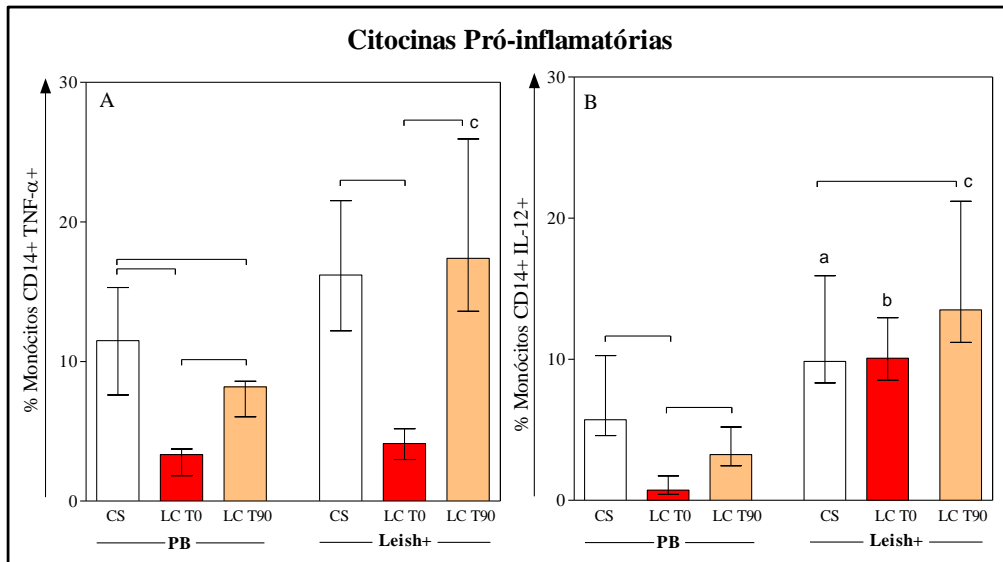
**Figura 10.** Avaliação dos níveis de NO intracelular em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS,  $n = 10$ ), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0,  $n = 10$ ) e 90 dias após o tratamento (LC T90,  $n = 10$ ), em culturas de produção basal (PB) e em culturas estimuladas com formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish<sup>+</sup>). Os resultados estão apresentados como percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CS, LC T0 e LC T90 estão representadas pelas linhas conectoras. Já as diferenças estatisticamente significativas entre a cultura de produção basal (PB) e a cultura estimulada (Leish<sup>+</sup>) dos grupos CS e LC T90 estão representadas pelas letras "a" e "c" respectivamente.

## 5.4 Caracterização do perfil de produção de citocinas intracelulares por monócitos do sangue periférico.

### 5.4.1 Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias

A Figura 11 representa a análise do perfil de produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-12 por monócitos do sangue periférico.

Nas culturas de avaliação da produção basal (PB) das citocinas, observou-se redução no percentual de monócitos TNF- $\alpha^+$  nos grupos LC T0 ( $p = 0,0002$ ) e LC T90 ( $p = 0,0435$ ) quando comparados ao grupo CS e menor percentual de monócitos TNF- $\alpha^+$  no grupo LC T0 ( $p = 0,0188$ ) quando comparado ao grupo LC T90. Na presença das formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* foi observado menor percentual de monócitos TNF- $\alpha^+$  no grupo LC T0 quando comparado aos grupos CS ( $p < 0,0001$ ) e LC T90 ( $p < 0,0001$ ). Os dados demonstraram ainda maior percentual de monócitos TNF- $\alpha^+$  em culturas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* quando comparadas as culturas de produção basal, no grupo LC T90 ( $p = 0,0005$ ). Em relação à produção de IL-12, foi observado menor percentual de monócitos IL-12 $^+$  no grupo LC T0 quando comparado aos grupos CS ( $p = 0,0056$ ) e LC T90 ( $p = 0,0028$ ), em culturas de produção basal. Já em culturas com promastigotas de *L. braziliensis* foi observado maior percentual de monócitos IL-12 $^+$  no grupo LC T90 ( $p = 0,0274$ ) em relação ao grupo CS. Foi observado ainda, maior percentual de monócitos IL-12 $^+$  em culturas estimuladas quando comparadas as culturas PB, nos grupos CS ( $p = 0,0053$ ), LC T0 ( $p = 0,0003$ ) e LC T90 ( $p = 0,0002$ ).

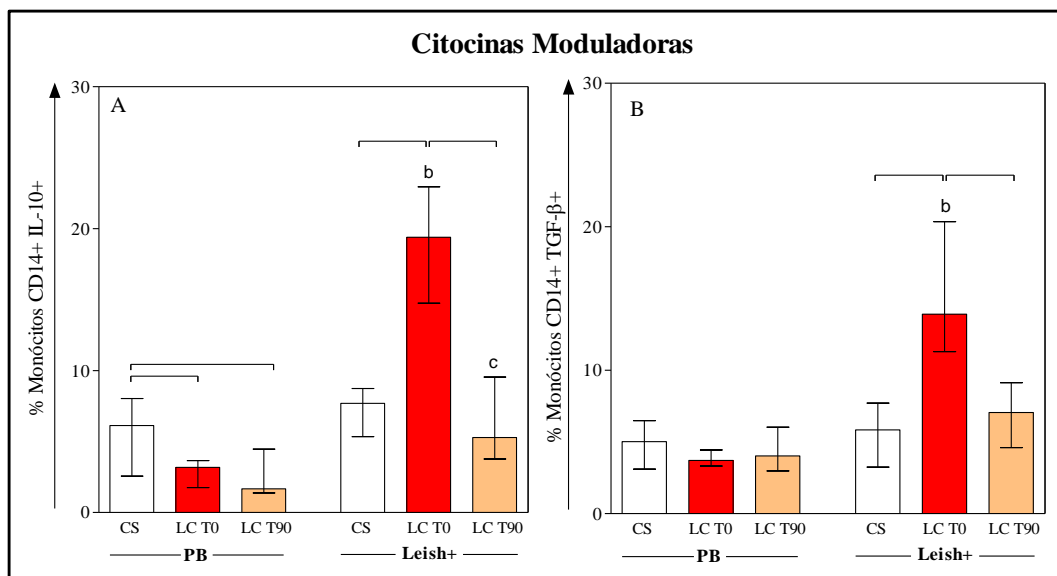


**Figura 11.** Avaliação do perfil de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (Figura 11A) e IL-12 (Figura 11B) em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish<sup>+</sup>). Os resultados estão apresentados como percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>CITOCINAS<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CS, LC T0 e LC T90 estão representadas pelas linhas conectoras. Já as diferenças estatisticamente significativas entre a cultura de produção basal (PB) e a cultura estimulada (Leish<sup>+</sup>) dos grupos CS, LC T0 e LC T90 estão representadas pelas letras “a”, “b” e “c” respectivamente.

#### 5.4.2 Avaliação da produção de citocinas moduladoras

A Figura 12 abaixo representa a análise do perfil de produção das citocinas moduladoras IL-10 e TGF- $\beta$  por monócitos do sangue periférico.

Os dados demonstraram menor percentual de monócitos IL-10<sup>+</sup> nos grupos LC T0 ( $p = 0,0054$ ) e LC T90 ( $p = 0,0178$ ) quando comparados ao grupo CS, em culturas de produção basal. Já nas culturas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*, foi observado maior percentual de monócitos IL-10<sup>+</sup> e TGF- $\beta$ <sup>+</sup> no grupo LC T0 quando comparado aos grupos CS ( $p = 0,0030$ ;  $p = 0,0010$ ) e LC T90 ( $p = 0,0078$ ;  $p = 0,0056$ ). Foi observado ainda, maior percentual de monócitos IL-10<sup>+</sup> em culturas estimuladas quando comparadas as culturas PB, nos grupos LC T0 ( $p = 0,0010$ ) e LC T90 ( $p = 0,0188$ ), e maior percentual de monócitos TGF- $\beta$ <sup>+</sup> em culturas estimuladas quando comparadas as culturas PB, no grupo LC T0 ( $p = 0,0028$ ).



**Figura 12.** Avaliação do perfil de citocinas moduladoras IL-10 (Figura 12A) e TGF-β (Figura 12B) em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (CS, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish<sup>+</sup>). Os resultados estão apresentados como percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>CITOCINAS<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras que destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos CS, LC T0 e LC T90 estão representadas pelas linhas conectoras. Já as diferenças estatisticamente significativas entre a cultura de produção basal (PB) e a cultura estimulada (Leish<sup>+</sup>) dos grupos LC T0 e LC T90 estão representadas pelas letras “b” e “c” respectivamente.

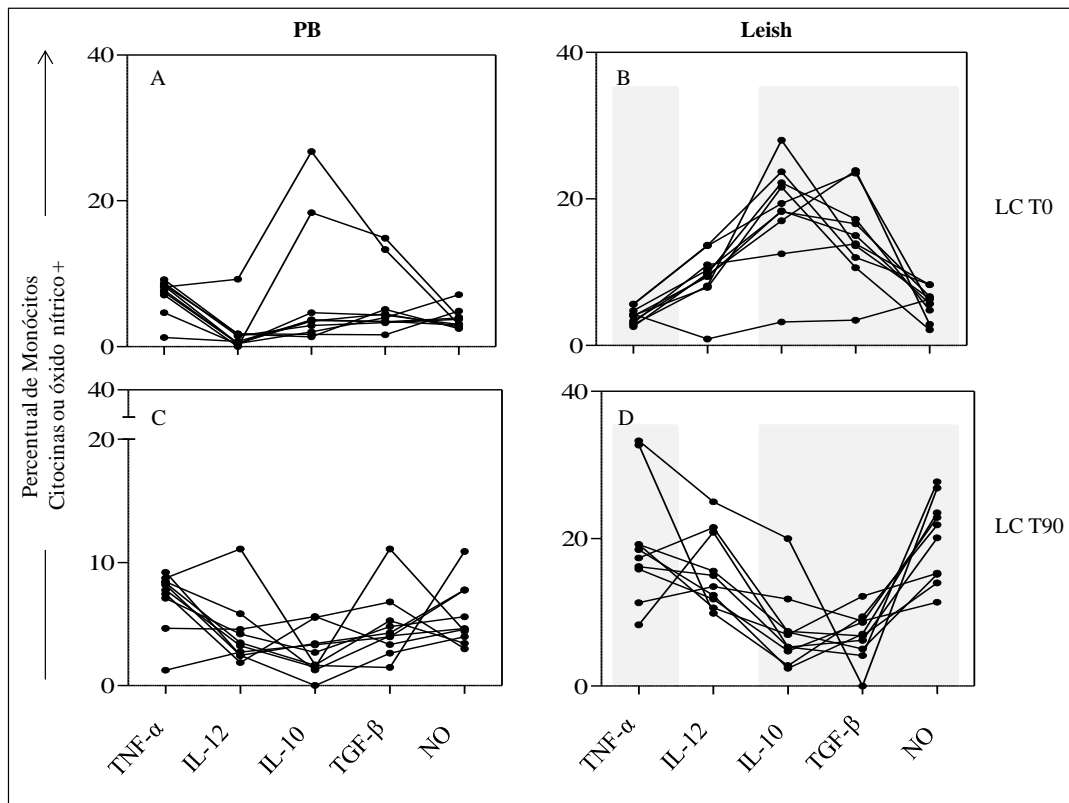
### 5.5 Avaliação dos aspectos funcionais – abordagem longitudinal

Após análise dos dados comparativos entre os grupos CS, LC T0 e LC T90 foi de nosso interesse avaliar o perfil funcional de monócitos em condições basais (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*, considerando cada paciente incluído no estudo antes do tratamento e que foram acompanhados até total reepitalização das lesões. Essa abordagem visa conhecer o comportamento funcional de monócitos dos pacientes individualmente e observar se foi mantido para todos eles o perfil descrito para o grupo nas análises feitas nos itens 5.3 e 5.4

Assim, a Figura 13 abaixo representa o perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias e moduladoras e de óxido nítrico por monócitos do sangue periférico de pacientes com LCL antes e 90 dias após tratamento com Glucantime®.

Nossos dados demonstraram claramente perfil imune modulado com maior produção de IL-10 e TGF-β associada à menor produção de TNF-α e NO por monócitos de pacientes com LCL após cultura com formas promastigotas de *L. braziliensis* (Figura 13B). Esse perfil foi padrão para todos os pacientes avaliados. Por outro lado, ao reavaliarmos os pacientes 90

dias após o término do tratamento, observamos perfil imune pró-inflamatório com maior produção de TNF- $\alpha$  e NO e menor produção de IL-10 e TGF- $\beta$  por monócitos de pacientes com LCL após cultura com formas promastigotas de *L. braziliensis* (Figura 13D).



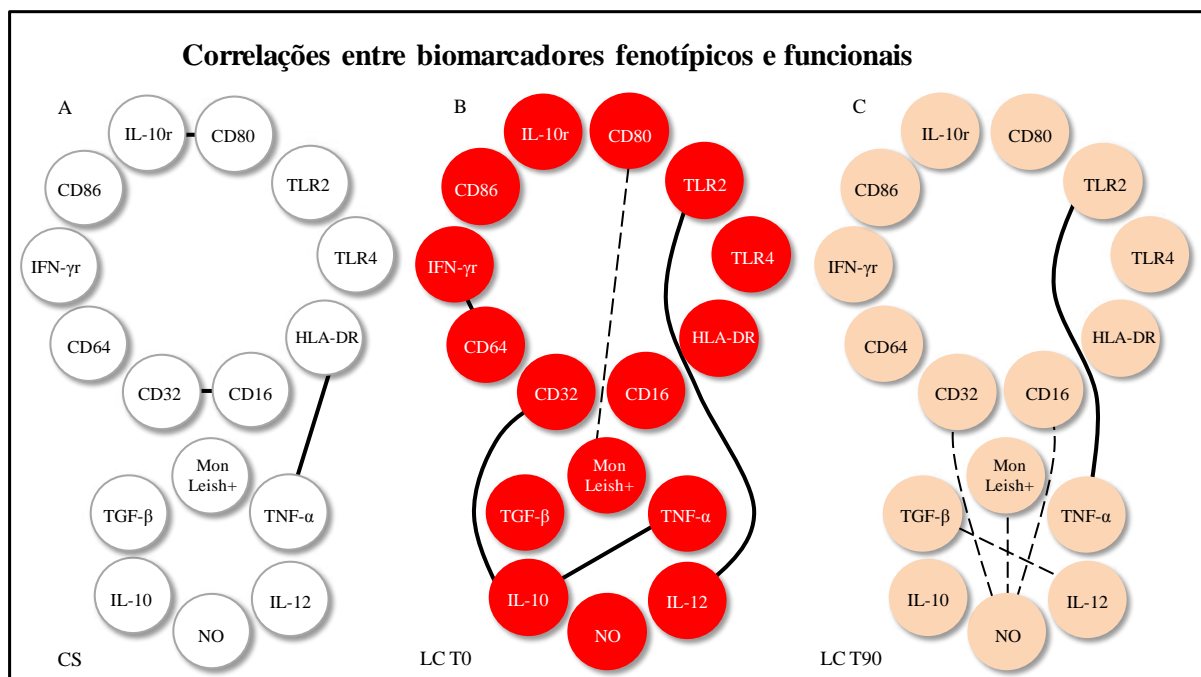
**Figura 13.** Avaliação do perfil de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ /IL-12 e moduladoras IL-10/TGF- $\beta$  e de NO em monócitos do sangue periférico de pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (LC T0, n = 10) e 90 dias após o tratamento (LC T90, n = 10), em culturas de produção basal (PB) e em culturas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish+). Os resultados estão apresentados como percentual de monócitos CITOCINAS<sup>+</sup> ou NO<sup>+</sup> em formato de gráficos de linhas de cada paciente avaliado antes e após tratamento com Glucantime®. Os retângulos em cinza destacam os achados de maior relevância para compreensão do perfil imunológico na LCL.

### 5.6 Correlação entre os aspectos fenotípicos e os aspectos funcionais de monócitos do sangue periférico na presença de formas promastigotas de *L. braziliensis*, avaliados antes e após tratamento.

A análise das correlações entre biomarcadores fenotípicos e funcionais de monócitos do sangue periférico na presença de formas promastigotas de *L. braziliensis* está representada na Figura 14.



No grupo CS (Figura 14A), foram observadas correlações positivas entre a expressão de CD16 e CD32, HLA-DR e TNF- $\alpha$ , IL-10R e CD80. Já no grupo LC T0 (Figura 14B), foram observadas correlações positivas entre a expressão de TLR2 e IL-12, CD64 e IFN- $\gamma$ R, CD32 e IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-10, e correlação negativa entre a expressão de CD80 e o percentual de monócitos Leish<sup>+</sup>. No grupo LC T90 (Figura 14C) foi observada correlação positiva entre a expressão de TLR2 e TNF- $\alpha$  e correlação negativa entre CD16 e NO, CD32 e NO, percentual de monócitos Leish<sup>+</sup> e NO, IL-12 e TGF- $\beta$ .

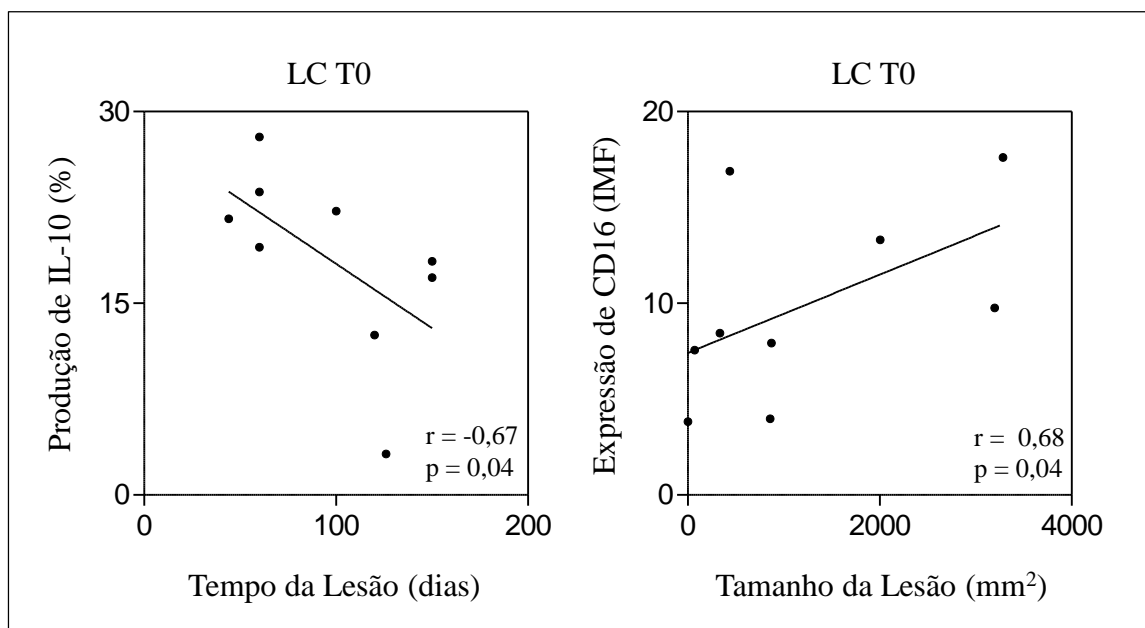


**Figura 14.** Redes de correlações entre biomarcadores fenotípicos e funcionais de monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos: controle (A, n = 10), pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* avaliados antes do tratamento (B, n = 10) e 90 dias após o tratamento (C, n = 10). As linhas contínuas representam as correlações significativas positivas fortes ( $r > 0,68$ ) e as linhas tracejadas representam as correlações significativas negativas entre os biomarcadores avaliados.

### 5.7 Correlação entre os aspectos fenotípicos e os aspectos funcionais de monócitos e tempo de evolução e tamanho das lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada.

A Figura 15 representa as análises de correlação entre biomarcadores fenotípicos e funcionais e tempo de lesão e tamanho da lesão (área total da lesão). Foram apresentados apenas os gráficos onde observamos correlações estatisticamente significativas nas culturas

realizadas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*. Os dados demonstraram correlação negativa entre o percentual de monócitos IL-10<sup>+</sup> e o tempo de evolução das lesões ( $r = -0,67$ ;  $p = 0,04$ ) e correlação positiva entre a expressão do receptor CD16 por monócitos e o tamanho das lesões ( $r = 0,68$ ;  $p = 0,04$ ) em pacientes com leishmaniose cutânea, antes do tratamento (LC T0).



**Figura 15.** Correlação entre IL-10 *versus* Tempo de Lesão e CD16 *versus* Tamanho de Lesão em pacientes com leishmaniose cutânea, antes do tratamento nas culturas realizadas na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*. Os valores de “r” estão representados nos gráficos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## **6. DISCUSSÃO**

## 6.DISSCUSSÃO

Diferentes autores têm demonstrado a importância do estado imunológico de pacientes com leishmaniose tegumentar na evolução da doença, e atribuem ao sistema imunológico importante função no controle da reativação da doença após o desaparecimento das lesões primárias (Walton *et al.*, 1973).

Na leishmaniose, a resposta imune protetora é predominantemente mediada por células. Estudos de Kobayashi & DeLeo, (2009) mostraram que os eventos iniciais da infecção por *Leishmania* spp. são de extrema importância no desenvolvimento de resposta imune celular protetora ou favorável à infecção. Neste sentido, o estudo das células da imunidade inata como neutrófilos, monócitos/ macrófagos e células dendríticas são de grande relevância para o entendimento da formação do ambiente inflamatório que promove o direcionamento da infecção.

Os monócitos/macrófagos são considerados as principais células hospedeiras, permitindo a sobrevivência e multiplicação de amastigotas de *Leishmania* spp., na ausência dos mecanismos leishmanicidas (Awasthi *et al.*, 2004).

No sítio da infecção, a interação *Leishmania*-macrófago é crucial para o direcionamento da doença. Inicialmente, os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes na superfície de células hospedeiras reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) da *Leishmania*. Dentre os PRRs, destacam-se os receptores Toll (TLRs), importantes na vigilância e remoção dos parasitos no sítio da infecção (Launois *et al.*, 1995, Sacks & Noben-trauth, 2002). Os TLRs estão envolvidos em uma variedade de fenômenos celulares, dentre eles pode-se destacar: fagocitose, maturação, atividade microbicida do fagossoma via indução da expressão de iNOS, bem como produção de citocinas moduladoras e pró-inflamatórias (Singh, Srivastava & Singh 2012). Após o reconhecimento de antígenos específicos do parasito, os TLRs ativam os fatores de transcrição NF-κB, ativador de proteína-1 (AP-1) e fator regulador de interferon (IRFs), que promovem a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias (Beutler *et al.*, 2006; O'Neill & Bowie, 2007; Tuon *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2012; Faria *et al.*, 2012).

O lipofosfoglicano (LPG) é a molécula de superfície majoritária em formas promastigotas e participa do reconhecimento da *Leishmania* spp. pelos macrófagos. Segundo Tuon *et al.* (2012), o LPG é reconhecido como PAMP pelo receptor TLR-2 de macrófagos e, essa ativação, desencadeia uma resposta do tipo 1, o que contribui para eliminação da infecção. Na verdade, a resposta imune de macrófagos é diferenciada considerando os

distintos LPGs das diferentes espécies de *Leishmania* (Ibraim *et al.*, 2013). Ibraim *et al.* (2013) descreveram maior produção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e NO por macrófagos estimulados com LPG de *L. braziliensis*, via TLR-4 mas, especialmente, via TLR-2. No entanto, Tuon *et al.* (2012), demonstraram maior expressão de receptores TLR-2 e TLR-4 em lesões de pacientes portadores de LCL infectados com *L. braziliensis*, mas sem correlação com produção de citocinas. Kavvoosi, Ardestani & Kariminia (2009) demonstraram que o reconhecimento do LPG de *L. major*, via TLR-2, pode levar à ativação de NF- $\kappa$ B e produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-10, bem como espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, Guerra *et al.*, (2010) mostraram em camundongos deficientes de TLR-2, redução da carga parasitária e do recrutamento de células inflamatórias durante os estágios iniciais da infecção por *L. amazonensis*. Também segundo Kavvoosi *et al.* (2009) e Kavvoosi *et al.* (2010), a sinalização via TLR-2 por LPG de *L. donovani* meta-cíclicos é menos imunogênico para células de mamíferos, provando a eficiência da transformação da *Leishmania* spp. que, por um mecanismo relativamente comum, sai do flebótomo e é reconhecida pelo macrófago do vertebrado, mas sem induzir resposta imune muito intensa, aumentando suas chances de infecção (Kavvoosi *et al.*, 2010). No entanto, Chandra & Naik (2008) demonstraram que a queda na expressão de TLR-2 está associada à redução da produção de IL-12 e aumento de IL-10 na infecção por *L. donovani*, favorecendo à progressão da doença. Esses achados sugerem não haver um consenso quanto ao papel de receptores Toll na resposta imune anti-*Leishmania* e que não apenas as diferenças de LPG das diferentes espécies do parasito, mas outros fatores como poliporfismos desses receptores, poderiam estar associados às diferentes respostas encontradas. Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado que Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) em TLRs podem levar a maior susceptibilidade às doenças infecciosas (Lorenz *et al.*, 2002; Agnese *et al.*, 2002; Mockenhaupt *et al.*, 2006).

No presente estudo, foi demonstrado que monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de LC, avaliados antes e após o tratamento, apresentaram menor interação monócito-*Leishmania*. Nossos dados corroboram os achados de Giudice *et al.*, (2012), que observou menor capacidade fagocítica em pacientes com LC ativa. Em pacientes com LC ativa as funções efetivas das células fagocíticas, principalmente monócitos e macrófagos, encontram-se comprometidas devido ao parasitismo e a modulação exercida sobre essas células pela *Leishmania*. Além da redução da interação monócito-*Leishmania* em pacientes com LC avaliados antes e 90 dias após o tratamento, observamos baixa expressão de TLR-2

associada à forte correlação com a produção de IL-12 e TNF- $\alpha$ , importantes citocinas envolvidas na ativação de resposta imune tipo 1 que favorece a ativação de mecanismos leishmanicidas de macrófagos. Além disso, foi possível observar maior expressão de TLR-4 em monócitos de pacientes antes e 90 dias após tratamento, tanto na ausência quanto na presença de *L. braziliensis*. Possivelmente a baixa expressão de TLR-2 poderia ajudar a explicar a menor interação monócito-*Leishmania* observada no grupo dos pacientes com a doença ativa e também o perfil funcional dessas células observado nesse grupo de estudo e que será discutido abaixo. Parece não haver papel importante de TLR-4 na infecção por *L. braziliensis*, mesmo tendo sido observada elevada expressão desse receptor em nosso estudo. Quanto à baixa interação monócito-*Leishmania* observada no grupo de pacientes avaliados após tratamento com Glucantime®, pode estar relacionada à menor susceptibilidade desses indivíduos que podem desenvolver resposta imune mais rápida e eficaz contra o parasito (Reis *et al.*, 2009). Além disso, sabemos que para sobreviver, a *Leishmania* spp. necessita ser internalizada por monócitos, mas, a partir do momento que o indivíduo se torna imunocompetente, os parasitos fagocitados são destruídos rapidamente devido à ativação eficaz das células infectadas (Souza *et al.*, 2012). Então, embora tenhamos observado que em 90 dias após tratamento a capacidade fagocítica dos monócitos ainda permanece baixa, acreditamos que essas células sejam funcionalmente capazes de promover o “clearance” do parasito e controlar a infecção quando de um segundo contato. Como será discutido abaixo, nossos dados de avaliação funcional dessas células dão suporte a essa hipótese.

Parasitos do gênero *Leishmania* se ligam a macrófagos não apenas via receptores Toll, mas principalmente por mecanismos de opsonização específica (Peters *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2011a). O mecanismo de opsonização específica envolve as proteínas do sistema do complemento e anticorpos IgG. Receptores Fc $\gamma$ , receptores de complemento (CRs) e manose (MR) são igualmente importantes para a internalização de *Leishmania* spp. (Peters *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2011a). A participação de receptores Fc $\gamma$  nos processos de internalização e no desenvolvimento da resposta imune anti-*Leishmania* foi investigada em vários estudos (Kima *et al.*, 2000; Kane & Mosser, 2001; Buxbaum & Scott, 2005; Miles *et al.*, 2005; Woelbing *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2011a). Eles compõem uma interface entre a resposta imune celular e a humoral (Soares *et al.*, 2006), os quais parecem decisivos e antagonizam-se na patogênese da leishmaniose humana (Santana, 2014). Estudos utilizando camundongos infectados com diferentes espécies de *Leishmania* têm associado os receptores Fc $\gamma$  e anticorpos à exacerbação da LT, contribuindo para o aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias e moduladoras, tais como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , resultando em cargas

parasitárias mais elevadas e, conseqüentemente, no desenvolvimento de lesões maiores e mais difíceis de curar (Kima *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 1995, Kima *et al.*, 2000; Kane & Mosser, 2001; Buxbaum & Scott, 2005; Miles *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011a).

Em nosso estudo, foi observado que monócitos de pacientes portadores de LCL apresentaram maior expressão de CD16. Foi demonstrado também que a interação monócito-formas promastigotas de *L. braziliensis* aumentou ainda mais a expressão desse receptor. Além disso, observamos correlação positiva entre expressão de CD16 por monócitos e tamanho das lesões cutâneas apresentadas por pacientes com doença ativa e correlação negativa entre a expressão de CD16 e produção de NO após a cura clínica. Vários estudos têm mostrado que as subclasses de IgG predominantemente detectadas na LCL são IgG1 e IgG3 (Souza *et al.*, 2005; Ozbilge *et al.*, 2006) que se ligam preferencialmente ao CD16, sugerindo que este receptor desempenha papel crítico na doença crônica (Bolaji *et al.*, 2008). Soares *et al.* (2006) demonstraram maior expressão de CD16 em monócitos de pacientes portadores de LCL e também sugeriram papel deletério para esse receptor na leishmaniose humana bem como seu uso como marcador de gravidade da doença. Considerando os achados do nosso estudo, sugerimos também que CD16 estaria associado à presença de resposta inflamatória, crítica durante a evolução da doença e gravidade das lesões. Nossos dados demonstraram ainda que embora exista menor expressão de CD32 no grupo LC T0, existe forte correlação entre a expressão desse receptor e a produção de IL-10 e correlação negativa entre CD32 e produção de NO após 90 dias do tratamento. Diante desses resultados, sugerimos a participação de CD32 como biomarcador envolvido na internalização de *Leishmania* e o estabelecimento da infecção. Já o receptor Fc $\gamma$  de alta afinidade por IgG, CD64, é uma molécula particularmente importante em virtude do seu papel na mediação da ADCC e na liberação de vários mediadores pró-inflamatórios (Bovolenta *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2011a). Neste sentido, a relação de CD64 com a produção citocinas pró-inflamatórias pode explicar o aumento na expressão desse receptor Fc $\gamma$  por monócitos de pacientes curados avaliados 90 dias após o tratamento, uma vez que observamos maior produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 além de maior expressão do receptor de IFN- $\gamma$  em monócitos após cura clínica.

Segundo alguns autores (Da-Cruz *et al.* 1994; Castellano *et al.* 2009; Reis *et al.* 2009; Brelaz *et al.*, 2012; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2012), células de pacientes curados após tratamento específico, principalmente linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e células NK, produzem IFN- $\gamma$  que ativam macrófagos. Embora em nosso estudo não tenhamos avaliado o perfil de produção de IFN- $\gamma$ , por termos focado nos monócitos/macrófagos que são as células alvo do parasito, nossos dados de avaliação do perfil de expressão do receptor dessa citocina

corroboram com a literatura, uma vez que observamos maior expressão de IFN- $\gamma$ R em monócitos de pacientes curados, sugerindo ativação dessas células para o controle da infecção. Por outro lado, monócitos de pacientes doentes apresentaram maior expressão do receptor da citocina IL-10 (IL-10R) e, esse aumento, foi acompanhado por elevados níveis desta citocina intracelular. Além disso, *L. braziliensis* induziu a expressão de IL-10R, uma vez que foi observado maior percentual de monócitos IL-10R<sup>+</sup> em culturas na presença das promastigotas quando comparadas às culturas na ausência destes parasitos. Tem sido demonstrado que há aumento da produção de IL-4 e IL-10 durante a fase inicial da infecção, sugerindo que essas citocinas estejam associadas à “*down-regulation*” da resposta do tipo 1, facilitando o estabelecimento da infecção, via inibição de mecanismos leishmanicidas de macrófagos.

Os nossos resultados mostraram menor expressão de HLA-DR tanto no grupo LC T0 quanto no grupo LC T90. No entanto, acreditamos não haver prejuízo na ativação de resposta imune adaptativa, essencial para o direcionamento da resposta anti-*Leishmania* durante a infecção ativa, que poderia ocorrer devida à baixa expressão de HLA-DR observada. A baixa expressão de HLA-DR é importante para o momento inicial de estabelecimento da infecção, mas, com a evolução da doença e cronicidade da mesma, mesmo em condições onde temos baixa expressão de HLA-DR, mecanismos alternativos (ativação via receptores Fc $\gamma$ , por exemplo) poderiam estar associados ao desenvolvimento de resposta pró-inflamatória necessária ao controle do parasitismo e evolução das lesões. É possível observar também que na avaliação após o tratamento com Glucantime®, já há tendência a aumento na expressão de HLA-DR sugerindo que a normalização no perfil de expressão de HLA-DR seja um fenômeno tardio após a cura e que dão suporte à hipótese de que após tratamento e cura clínica, uma resposta favorável ao controle da infecção estaria presente em caso de um novo contato com o parasito. Talvez uma avaliação após 12 meses do tratamento poderia mostrar um perfil diferenciado, com níveis normais de expressão de HLA-DR.

Estudos sugerem que a expressão de CD40, CD80 e CD86 tem um impacto significativo na resposta imune anti-*Leishmania* (Brodskyn *et al.*, 2001). Tem sido descrito que CD80 recruta e se liga preferencialmente a CTLA-4, enquanto CD86 recruta CD28 (Pentcheva-Hoang *et al.*, 2004). Recentemente, foi demonstrado e sugerido em doenças humanas que, a expressão de CD80 é up-regulada, enquanto CD86 é down-regulada, o que levaria ao aumento da gravidade da inflamação (Nolan *et al.*, 2009). Vieira *et al.*, (2013) mostraram em pacientes portadores de LCL, diminuição na expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 tanto em culturas não estimuladas quanto na presença de SLA



(antígeno solúvel de *Leishmania*). Nossos dados se assemelham aos achados de Vieira *et al.*, (2013) no que diz respeito a expressão de CD86, uma vez que observamos queda na densidade de expressão de CD86 tanto em culturas não estimuladas quanto na presença de promastigotas de *L. braziliensis*. Entretanto, após o tratamento, há significativo aumento da expressão de CD86 em monócitos em relação ao período antes do tratamento, além de haver tendência a normalização no perfil de expressão deste marcador em relação ao grupo controle, que poderia estar associada ao controle da infecção.

Dentre os aspectos funcionais dos monócitos/macrófagos infectados, destacam-se as ações leishmanicidas do NO, como a inibição da respiração mitocondrial, inativação de peroxidases aumentando a susceptibilidade ao dano oxidativo, a inibição da glicólise, mutação, inibição dos mecanismos de reparo e síntese de DNA e peroxidação dos lipídios de membrana (Giudice *et al.*, 2007). No presente estudo, foi observada menor produção de NO em monócitos de pacientes portadores de LCL avaliados antes do tratamento, diferentemente, de Assis Souza *et al.* (2013) que observaram maior produção de NO em pacientes com LT ativa quando comparado aos mesmos curados e avaliados 12 meses após o término do tratamento. Nossos dados demonstraram maior produção de NO em culturas com promastigotas de *L. braziliensis* em relação às culturas de produção basal, em indivíduos saudáveis e pacientes avaliados 90 dias após tratamento. Carminatti (2007) observou maior produção de peróxido de oxigênio por monócitos de indivíduos portadores de LT quando comparado a indivíduos saudáveis. Em estudos feitos por quimioluminescência também foram encontrados níveis de radicais de oxigênio significativamente maiores em pacientes com leishmaniose cutânea do que os encontrados em controles normais (Kocyigit, 2002; Carminatti, 2007). Estudos com outras espécies de *Leishmania* demonstraram que promastigotas foram capazes de induzir a produção de ROS por fagócitos (Channon *et al.*, 1984; Mallinson & Coombs, 1989; Phan *et al.*, 2005; Novais *et al.*, 2014). No entanto, é conhecido que a *Leishmania* spp. apresenta diversos mecanismos de escape que envolve a modulação do sistema imune, dentre eles pode-se destacar a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias que são essenciais para a indução da síntese de NO. Acreditamos que este fenômeno possa corroborar para o entendimento dos nossos dados, uma vez que associado à baixa produção de NO no grupo LC T0, também observamos menor produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 por monócitos desses pacientes.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina fundamental na defesa contra patógenos intracelulares e os macrófagos são a principal fonte de produção (Bazzoni & Beutler, 1996; Körner & Sedgwick, 1996; Körner *et al.*, 2010). Na LC, alguns autores já demonstraram que a ação conjunta de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  estimula a produção de NO via iNOS, o que leva a destruição da *Leishmania*

spp. (Green *et al.*, 1990; Stenger *et al.*, 1994; Qadoumi *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2003; Horta *et al.*, 2012). Giudice *et al.* (2012) mostraram que macrófagos infectados por *L. braziliensis*, de pacientes portadores de LC e LM, produziram mais TNF- $\alpha$ , que macrófagos de pacientes considerados assintomáticos ou subclínicos. No presente estudo, culturas de monócitos de pacientes com lesão cutânea ativa avaliados antes do tratamento apresentaram menor percentual de monócitos TNF- $\alpha^+$  quando comparado a pacientes avaliados após o tratamento e indivíduos saudáveis. Nossos dados corroboram com de Assis Souza *et al.* (2013) que demonstraram menor produção de TNF- $\alpha$  em pacientes com LT ativa quando comparado aos pacientes avaliados após 12 meses do término do tratamento. No presente estudo, foi demonstrado ainda que a presença de formas promastigotas de *L. braziliensis* induziu aumento no percentual de monócitos TNF- $\alpha^+$  no grupo dos pacientes curados avaliados 90 dias após tratamento. Após o tratamento específico, os pacientes tornam-se capazes de montar uma resposta imune mais eficaz, dessa forma, após estímulo com promastigotas *L. braziliensis*, estes apresentam maior frequência de produção de TNF- $\alpha$ , citocina essencial para o combate ao parasito. Esse resultado sugere que os processos decorrentes da interação *Leishmania*-monócito são indispensáveis para a produção dessa citocina.

A IL-12 é uma citocina produzida por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Watford *et al.*, 2003), e que tem importância no direcionamento da resposta imune do tipo 1, uma vez que promove estimulação dos linfócitos T e a produção de IFN- $\gamma$ , desencadeando o processo de ativação de macrófagos e eliminação do parasito. No presente estudo, foi observado, em culturas na ausência de promastigotas de *L. braziliensis*, menor percentual de monócitos IL-12<sup>+</sup> no grupo de pacientes com lesão ativa quando comparado aos mesmos pacientes após cura clínica e indivíduos saudáveis. Por outro lado, foi possível observar que a presença do parasito potencializa a produção de IL-12, pois houve maior percentual de monócitos IL-12<sup>+</sup> em culturas com promastigotas de *L. braziliensis*, em relação às culturas de produção basal, em todos os grupos de estudo. A produção dessa citocina demonstra sua participação no processo inflamatório necessário ao combate do parasito.

Os resultados obtidos para pacientes curados, após o tratamento específico, demonstraram capacidade em desencadear resposta eficaz e efetiva contra o parasito, o que pode ser explicado pelo contato anterior com o parasito e memória imunológica desenvolvida. Assim, a presença de TNF- $\alpha$  e IL-12 em indivíduos curados, mostra que essas citocinas poderiam estar envolvidas na manutenção da cura clínica desses pacientes, evitando reativação.

Destaca-se ainda as citocinas moduladoras IL-10 e TGF- $\beta$ . Macrófagos, células dendríticas, células T reguladoras, entre outras células, podem contribuir para produção de IL-10 nas leishmanioses (Campanelli *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2012). É sabido que na LV, a IL-10 e TGF- $\beta$  modulam a resposta Tipo 1, reduzem a proliferação linfocitária e a produção de IFN- $\gamma$  (Carvalho *et al.*, 1994a; Nysten & Sacks, 2007), porém, a função dessas citocinas na patogênese da LC ainda não está bem elucidada. Alguns autores mostraram que IL-10 favorece o crescimento parasitário na fase inicial da doença, o que contribui para o estabelecimento e manutenção da infecção (Chatelain, Mauze & Coffman, 1999; Salhi *et al.*, 2008; Castellano *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2012). De Assis Souza *et al.*, (2013), demonstraram maior produção de IL-10 em pacientes com LT ativa quando comparado aos mesmos pacientes curados, avaliados 12 meses após o término do tratamento. De-Campos *et al.* (2010), sugeriram que IL-10 poderia desativar células apresentadoras de antígenos infectadas, e que estas deixariam de responder ao estímulo de IFN- $\gamma$ . Assim como IL-10, já foi demonstrado que a produção de TGF- $\beta$  pode contribuir para o estabelecimento e proliferação da *Leishmania* no interior de células fagocíticas. Barral *et al.* (1995), mostraram aumento no crescimento dos parasitos em 50%, em culturas de macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis* estimuladas com TGF- $\beta$ , quando comparado a cultura controle. Essa mesma análise foi realizada na presença de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e foi observada queda de 40% e 30%, respectivamente, no crescimento dos parasitos. Nessa perspectiva, no presente estudo, foi observado maior percentual de monócitos IL-10<sup>+</sup> e TGF- $\beta$ <sup>+</sup> em culturas na presença de promastigotas de *L. braziliensis* quando comparadas as culturas na ausência do parasito, no grupo dos pacientes com lesão ativa avaliados antes do tratamento. Observamos ainda, correlação negativa entre o tempo de evolução das lesões cutâneas e o percentual de monócitos IL-10<sup>+</sup> em pacientes com doença ativa. Esse resultado mostra que *L. braziliensis* estimula a produção de IL-10 e TGF- $\beta$  sugerindo, dessa forma, que essas citocinas estão envolvidas nos processos que levam ao estabelecimento da doença (Belkaid *et al.*, 2002).

Embora tenha sido mostrado o papel de IL-10 no estabelecimento da infecção, também vem sendo discutido o papel de IL-10 na infecção crônica. Berg *et al.* (1995) demonstraram que IL-10 pode prevenir a resposta imune exacerbada, reduzindo o dano tecidual em um modelo de resposta inflamatória cutânea, mas não associado à LC. De fato, essa citocina aparenta desempenhar função semelhante na LC, pois já foi demonstrado por Ji *et al.* (2005) que células T reguladoras, produtoras de grande quantidade de IL-10, podem contribuir para redução do dano tecidual associado ao processo inflamatório nas lesões cutâneas. Além disso, a eliminação do parasito, na falta dessa citocina, tem sido associada à

perda de imunidade na reinfecção. Nossos achados corroboram com essa perspectiva, uma vez que observamos também, correlação positiva entre a produção de IL-10 e de TNF- $\alpha$  no grupo LC T0.

Em relação à resposta ao tratamento, já foi demonstrado que pacientes com alta expressão intralésional de IL-10 durante a fase inicial da infecção por *L. guyanensis*, não apresentaram resposta eficiente ao tratamento com isotionato de pentamidina (Bourreau *et al.*, 2001). Os autores sugerem que IL-10 pode prejudicar a resposta ao tratamento por inibir a síntese de citocinas do Tipo 1, como IL-12 e IFN- $\gamma$ , e/ou a maturação de células dendríticas que são essenciais para a efetividade da resposta imune. Nossos dados não corroboram esses achados com infecção por *L. guyanensis*, uma vez que, como já discutido anteriormente, observamos perfil pró-inflamatório associado à cura clínica com redução na produção de IL-10 e expressão do receptor de IL-10. Além disso, observamos correlação negativa entre a produção de IL-12 e de TGF- $\beta$ , o que reforça a ideia do envolvimento de IL-12 com perfil imunológico associado ao controle da doença.

Embora diversos estudos tenham se concentrado na elucidação do perfil de resposta ideal ao combate da infecção por *L. braziliensis*, o mesmo ainda permanece controverso. Deve-se considerar primeiramente, a diversidade de respostas que podem ser desencadeadas por indivíduos diferentes. Visando verificar a existência de um padrão de resposta imune diferenciado no grupo de pacientes incluídos em nosso estudo, foi realizada análise complementar dos aspectos funcionais de monócitos de cada paciente avaliado antes e após o tratamento, na ausência e presença de *L. braziliensis*, individualmente.

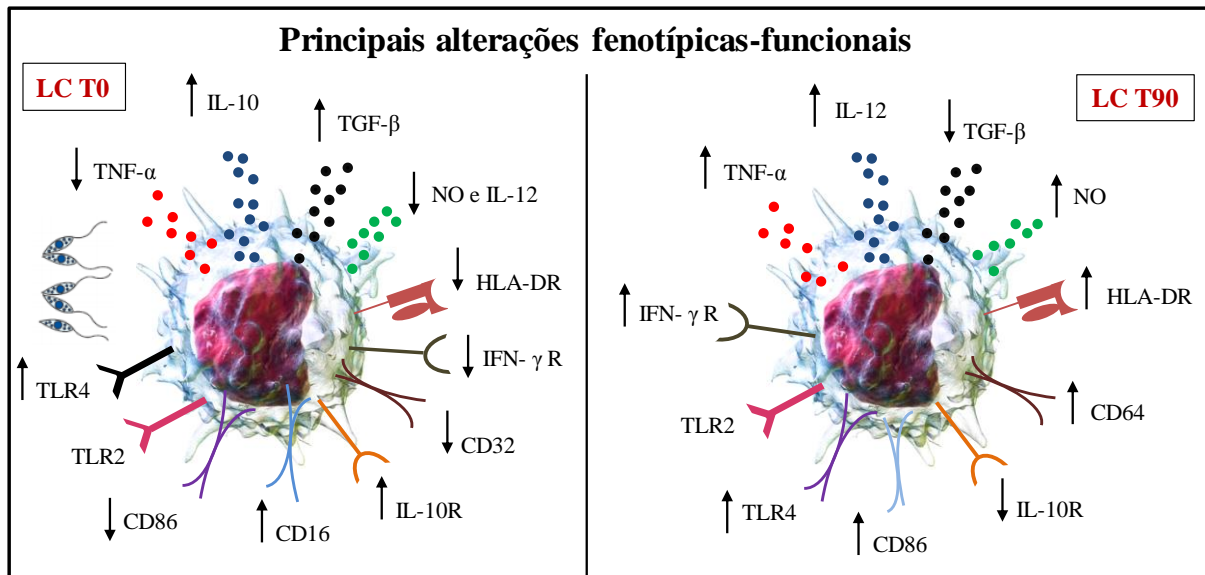
Nossos dados demonstraram claramente que pacientes com LCL antes do tratamento, apresentam padrão de perfil imune modulado com aumento do percentual de monócitos IL-10<sup>+</sup> e TGF- $\beta$ <sup>+</sup> associado à queda do percentual de monócitos TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, IL-12<sup>+</sup> e NO<sup>+</sup>, principalmente quando consideramos resultados após cultura com formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*. Conforme já foi descrito anteriormente, a presença de citocinas moduladoras na fase inicial pode favorecer o estabelecimento da infecção, mas, ao mesmo tempo, evita lesões teciduais extensas que podem ocorrer com a evolução da doença ativa. Embora não tenha sido possível avaliar os pacientes por grupos considerando tempo de evolução das lesões, nossos resultados sugerem o papel da IL-10 na fase inicial de estabelecimento da infecção e também no controle da resposta pró-inflamatória que aparece com a evolução da doença.

Por outro lado, 90 dias após o término do tratamento, foi observado perfil imune pró-inflamatório com aumento na produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO e redução na produção de IL-10 e TGF- $\beta$  por monócitos após cultura com formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*. Assim, após o tratamento, e cura clínica observada pela completa reepitalização das lesões, os pacientes apresentam capacidade de desencadear resposta imune pró-inflamatória quando de um segundo contato com o parasito, resposta essa que pode ser essencial para evitar reinfecção. Além disso, os resultados indicam boa resposta ao tratamento importante para evitar reativação das lesões cutâneas.

Resumidamente, em monócitos de pacientes doentes foi observado perfil pouco ativado (menor expressão de TLR-2, CD32, HLA-DR e CD86 e maior expressão de CD16 e IL-10R), associado à elevada produção das citocinas moduladoras IL-10 e TGF- $\beta$  e reduzida produção de NO e citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-12. É sabido que a *Leishmania* spp. é capaz de modular os monócitos reduzindo a expressão de marcadores de ativação, que levaria a produção de citocinas pró-inflamatórias e NO, responsáveis pela eliminação do parasito. Essa modulação favorece o estabelecimento e a proliferação da *Leishmania* spp. no interior das células hospedeiras. Dessa forma, pode-se dizer que foi observado perfil de resposta imune modulada, favorável ao estabelecimento da infecção. Contudo, esse perfil parece estar associado também a um contrabalanço da resposta pró-inflamatória, uma vez que análises de correlação mostraram correlação positiva entre a produção de IL-10 e de TNF- $\alpha$ , entre a expressão do receptor Fc $\gamma$  CD64 e IFN- $\gamma$  e entre a expressão de TLR2 e a produção de IL-12 nesses pacientes antes do tratamento.

É interessante observar no grupo LC T90 (tempo preconizado pelo MS para avaliação de cura clínica, no qual os pacientes que respondem bem ao tratamento apresentam total reepitalização das lesões) que, as principais diferenças em relação aos pacientes com doença ativa representam a menor capacidade fagocítica identificada pela menor interação monócito-*Leishmania* associada à expressão reduzida de IL-10R, e aumento da expressão de TLR-4, CD64, HLA-DR, CD86. Além disso, foi demonstrado aumento na expressão do receptor de IFN- $\gamma$ , citocina essencial para a ativação de monócitos/macrófagos e consequente produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO, biomarcadores que apresentaram maior produção por monócitos avaliados. Observamos ainda, correlação negativa entre a expressão dos receptores Fc $\gamma$  CD16 e CD32 e produção de NO e entre a produção de IL-12 e de TGF- $\beta$  por monócitos após o

tratamento. Esse perfil fenotípico reflete uma provável capacidade dos monócitos/macrófagos de controlar a infecção no caso de um novo contato com o parasito, protegendo clinicamente contra novas reinfecções.



**Figura 16.** Resumo das principais alterações fenotípicas-funcionais, entre os grupos LC T0 e LC T90 de monócitos do sangue periférico na presença de formas promastigotas *L. braziliensis*.

## **7. CONCLUSÃO**

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a identificação de biomarcadores na leishmaniose cutânea localizada associados à resposta inflamatória modulada. Foi possível observar maior produção de citocinas moduladoras IL-10 e TGF- $\beta$  e menor produção de NO associados à expressão aumentada dos receptores de IL-10 e FC $\gamma$  CD16 que correlacionou com tamanho da lesão cutânea. Este perfil imunológico parece ser importante na doença ativa de modo a contribuir para o estabelecimento da infecção. No entanto, com a evolução das lesões (fase tardia da infecção) que é caracterizada por presença marcante de resposta pró-inflamatória, parece que esse perfil modulado teria papel relevante no contrabalanço dessa resposta pró-inflamatória, sendo fator determinante de gravidade da doença.

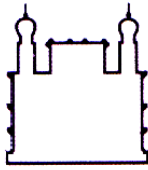
Por outro lado, após cura clínica e total reepitalização das lesões cutâneas que se segue ao tratamento com Glucantime<sup>®</sup>, fica evidente a resposta pró-inflamatória desencadeada pela *L. braziliensis*, onde observamos maior produção de NO, TNF- $\alpha$ , IL-12 e maior expressão de IFN- $\gamma$ R. Esse perfil pró-inflamatório, além de ser indicativo da boa resposta ao tratamento, seria importante para evitar a reativação das lesões cutâneas e estimular a capacidade dos monócitos/macrófagos em controlar a infecção no caso de um novo contato com o parasito na área endêmica.



## **8. ANEXOS**

## 8. ANEXOS

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética

### PARECER Nº 21/2008 – CEPESH- CPqRR

**Protocolo CEPESH/ CPqRR nº:** 20/2008

**Projeto de Pesquisa:** "Correlação entre persistência parasitária e perfil fenotípico-funcional de monócitos de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), tratados com o antimoniatado de N-metil Glucamina" – **Grupo III.**

**Pesquisador Responsável:** Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

**Instituição:** Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ

**Data de entrada no CEP:** 06/08/2008

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, constatou-se que o projeto atende aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela homologação do projeto de pesquisa proposto, bem como do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação: **PROJETO APROVADO**

João Carlos Pinto Dias  
Coordenador do CEPESH-CPqRR

*Dr. João Carlos Pinto Dias*  
COORDENADOR  
COMITÊ DE ÉTICA

Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido.

**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO NO  
PROJETO:**

**Correlação entre persistência parasitária e perfil fenotípico-funcional de monócitos de  
pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada (LCL), tratados com o  
antimoniato de N-metil glucamina**

**CONSENTIMENTO DO VOLUNTÁRIO OU RESPONSÁVEL**

Eu, \_\_\_\_\_, depois de participar do processo de seleção e ter sido considerado apto, estou sendo convidado a participar como voluntário em estudo prospectivo, tendo o direito de estar ciente dos procedimentos que serão realizados durante o estudo.

<b>RESPONSÁVEIS</b>	<b>MÉDICOS</b>
Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal Ana Rabello	Ana Rabello Andréia Coutinho de Faria Maria Camilo Ribeiro de Senna

Laboratório de Pesquisas Clínicas

Centro de Referência em leishmanioses

Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ

**INFORMAÇÕES GERAIS**

A leishmaniose tegumentar é uma doença causada por um parasito chamado *Leishmania* que infecta o ser humano pela picada de um inseto chamado flebótomo (mosquito palha). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, no período de 1985 a 2005, verificou-se uma média anual de 28.568 casos novos de leishmaniose tegumentar. Na região metropolitana de Belo Horizonte, de 2000 a 2005, foram notificados 942 casos da doença. A doença aparece como feridas na pele e algumas vezes podem também aparecer feridas dentro da boca, do nariz e da garganta (nas mucosas). Os médicos e pesquisadores não sabem ainda quais são as alterações da defesa do organismo do paciente que facilitam o aparecimento destas feridas. O estudo de

células de defesa presentes no sangue periférico do paciente pode ajudar a entender melhor a doença e a descoberta de novos tratamentos ou de uma vacina.

## **DESCRIÇÃO DA PESQUISA**

### **OBJETIVO**

Avaliar o perfil imunológico associado ao tratamento com N-metil Glucamina (Glucantime®) por meio do conhecimento da correlação entre a carga parasitária de *Leishmania* spp. e o perfil fenotípico-funcional de monócitos do sangue periférico com características clínicas de pacientes portadores de LCL.

### **DESCRIÇÃO DO ESTUDO**

Os pacientes que procurarem o Centro de Referência em Leishmanioses e que tiverem o diagnóstico de leishmaniose cutânea comprovado pelos exames adequados, serão convidados a participar da pesquisa. Se aceitarem, um pequeno fragmento de lesão, obtido por biópsia da ferida de pele será utilizado para avaliação da carga parasitária, no momento da primeira consulta antes do tratamento com Glucantime®. Já para a realização de ensaios de avaliação imunológica, serão realizadas coletas de sangue venoso (25 mL) em tubos contendo anticoagulante EDTA (5 mL) e heparina sódica (20 mL) no momento da primeira avaliação, 30 e 90 dias após tratamento com Glucantime®.

Todo o material coletado dos pacientes que aceitarem participar do estudo será coletado apenas para quantificação de DNA de *Leishmania* spp. e caracterização fenotípica-funcional de monócitos do sangue periférico no momento da primeira consulta e após 30 e 90 dias do tratamento específico, ou seja, não será utilizado em outras investigações.

Em caso de reações adversas ao tratamento, os pacientes serão avaliados seguindo critérios de toxicidade pelo Glucantime® segundo as orientações do MS e se necessário, esquema terapêutico de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose será indicado. Também em caso de falha terapêutica, esquema terapêutico de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose será indicado.

### **BENEFÍCIOS**

Sua participação neste trabalho não lhe trará benefício direto, além do que já lhe é assegurado pelo seu atendimento neste serviço. No entanto, o estudo trará maior conhecimento da doença em questão.

## **RISCOS POTENCIAIS**

Os procedimentos médicos a serem realizados têm risco mínimo. No entanto, em caso de efeito indesejável associado ao procedimento, caberá toda a responsabilidade ao médico responsável o acompanhamento do paciente até total cicatrização. A biópsia de pele será realizada no ambulatório do CRL/CPqRR/FIOCRUZ por médicos especialistas. É realizada a anestesia e com material cirúrgico adequado, retira-se um fragmento de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Não há necessidade de pontos cirúrgicos e a cicatrização se completa em torno de 10 dias. A biópsia de pele será realizada de acordo com o protocolo do CRL/CPqRR/FIOCRUZ. As coletas de sangue serão realizados por profissional técnico qualificado para essa função, seguindo procedimento estabelecido no CRL/CPqRR/FIOCRUZ.

## **PERMISSÃO PARA REVISÃO DOS DADOS /CONFIDENCIALIDADE**

Todos os seus registros serão confidenciais, isto quer dizer que todo esforço será feito no sentido de resguardar a confidencialidade dos dados fornecidos por você, bem como dos resultados de seus exames. Todavia, você fica informado pelo presente documento, que o acesso a essas informações pode ser permitido a um número limitado de integrantes da equipe médica responsável.

## **ENTENDIMENTO POR PARTE DOS PARTICIPANTES**

Eu pude fazer perguntas relacionadas com todos os exames e objetivos da pesquisa e os pesquisadores estavam aptos a respondê-las. Autorizo, por este documento, a minha inclusão neste projeto.

Fui informado e entendi que posso retirar meu consentimento e interromper minha participação neste projeto a qualquer momento, e que a suspensão de meu consentimento não impedirá que eu continue a receber a assistência médica necessária. Posso discutir as questões relacionadas aos meus direitos e os problemas relacionados com minha participação neste projeto, durante ou depois de sua realização, com os responsáveis pelo projeto, pelo telefone (031) 3349 7829 ou no CPqRR, situado à Av. Augusto de Lima, nº 1715, Barro Preto, Belo Horizonte.

## CONSENTIMENTO

Com base no exposto acima, dou meu consentimento para participar voluntariamente desta pesquisa. Tenho conhecimento que a minha cooperação com os compromissos marcados (consultas, exames) é essencial para o êxito do projeto, e autorizo os pesquisadores a me contatarem dentro de 15 dias, conforme as orientações que eu forneci, caso não justifique minha ausência a um compromisso marcado.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável legal (em caso de menores de 18 anos)

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## **9.REFERÊNCIAS**

## 9.REFERÊNCIAS

- AGNESE, DM; CALVANO, JE; HAHM, SJ; COYLE, SM; CORBETT, SA; CALVANO, SE; LOWRY, SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1522-1525.
- AMATO, VS; ANDRADE, JRHF; DUARTE, MI. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop.* 2003; 85: 39-49.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin and Exp Dermatol.* 2010; 35: 699-705.
- ANTONELLI, LR; DUTRA, WO; ALMEIDA, RP; BACELLAR, O; CARVALHO, EM; GOLLOB, KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* 2005; 101: 226-230.
- ANTONELLI, LR; DUTRA, WO; ALMEIDA, RP; BACELLAR, O; GOLLOB, KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol.* 2004; 136: 341-348.
- AWASTHI, A; MATHUR, RK; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J of Medical Research.* 2004; 119: 238-258.
- BACELLAR, O; LESSA, H; SCHRIEFER, A; MACHADO, P; RIBEIRO DE JESUS, A; DUTRA, WO; GOLLOB, KJ; CARVALHO, EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002; 70: 6734-6740.
- BACHA, HA; TUON, FF; ZAMPIERI, RA; FLOETER-WINTER, LM; OLIVEIRA, J; NICODEMO, AC; QUIROGA, MM; MASCHERETTI, M; BOULOS, M; AMATO, VS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105: 173-178.
- BARATTA-MASINI, A; TEIXEIRA-CARVALHO, A; MALAQUIAS, LC; MAYRINK, W; MARTINS-FILHO, OA; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Front Biosci.* 2007; 12: 839-849.
- BARRAL, A; JESUS, AR; ALMEIDA, RP, *et al.* Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1987; 9: 487-97.
- BARRAL, A; TEIXEIRA, M; REIS, P; VINHAS, V; COSTA, J; LESSA, H; BITTENCOURT, A. L; REED, S; CARVALHO, E. M; BARRAL-NETTO, M. Transforming Growth Factor- $\beta$ 3 in Human Cutaneous Leishmaniasis. *American J of Pathol.* 1995; 147.
- BAZZONI, F; BEUTLER, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1717-1725. Review.



- BELKAID, Y; BUTCHER, B; SACKS, DL. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 1389-1400.
- BELKAID, Y; PICCIRILLO, CA; MENDEZ, S; SHEVACH, EM; SACKS, DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 2002; 420: 502-507.
- BERG, DJ; LEACH, MW; KÜHN, R; RAJEWSKY, K; MÜLLER, W; DAVIDSON, NJ; RENNICK, D. Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med.* 1995; 182: 99-108.
- BERMAN, JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev. Inf. Dis.* 1988; 10: 560-586.
- BEUTLER, B; JIANG, Z; GEORGEL, P; CROZAT, K; CROKER, B; RUTSCHMANN, S; DU, X; HOEBE, K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24: 353-389. Review.
- BOLAJI, N; THOMAS, AND LAURENCE U; BUXBAUM. Fc $\gamma$ RIII Mediates Immunoglobulin G-Induced Interleukin-10 and Is Required for Chronic *Leishmania mexicana* Lesions. *Infection and Immunity.* Feb 2008; 623–631.
- BOURREAU, E; PRÉVOT, G; GARDON, J; PRADINAUD, R; LAUNOIS, P. High intralésional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. *J Infect Dis.* 2001; 184: 1628-1630.
- BOVOLENTA, C; GASPERINI, S; McDONALD, PP; CASSATELLA, MA. High Affinity Receptor for IgG (Fc $\gamma$ RI/CD64) Gene and STAT Protein Binding to the IFN- $\gamma$  Response Region (GRR) Are Regulated Differentially in Human Neutrophils and Monocytes by IL-10. *J Immunol.* 1998; 160: 911-919.
- BRELAZ, MC; DE OLIVEIRA, AP; DE ALMEIDA, AF; DE ASSIS SOUZA, M; MEDEIROS, ÂC; DE BRITO, ME; PEREIRA, VR. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. *Parasite Immunol.* 2012; 34: 236-239.
- BRELAZ-DE-CASTRO, MC; DE ALMEIDA, AF; DE OLIVEIRA, AP, *et al.* Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol.* 2012; 279 :180-186.
- BRODSKYN, CI; DEKREY, GK; TITUS, RG. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. *Infectious Immunol.* 2001; 69: 665-672.
- BUXBAUM, LU & SCOTT, P. Interleukin-10 and Fc $\gamma$  receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infection and Immunity.* 2005; 73: 2101.

CABRERA, M; SHAW, MA; SHARPLES, C; WILLIAMS, H; CASTES, M; CONVIT, J; BLACKWELL, JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 1995; 182: 1259-1264.

CAMARA COELHO, LI; PAES, M; GUERRA, JA; BARBOSA, MD; COELHO, C; LIMA, B; BRITO, ME; BRANDÃO FILHO, SP. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res.* 2011; 108: 671-677.

CAMPANELLI, AP; ROSELINO, AM; CAVASSANI, KA, *et al.* CD4+CD25+ T Cells in Skin Lesions of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Exhibit Phenotypic and Functional Characteristics of Natural Regulatory T Cells. *J of Infect Diseases.* 2006; 193: 1313-1322.

CARMINATTI, M. Avaliação da capacidade fagocitária, produção de peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral por monócitos de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana. *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.* 2007.

CARVALHO, EM; BACELLAR, O; BROWNELL, C; REGIS, T; COFFMAN, RL; REED, SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 1994; 152: 5949-5956.

CARVALHO, EM; CORREIA FILHO, D; BACELLAR, O; ALMEIDA, RP; LESSA, H; ROCHA, H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53: 273-7.

CARVALHO, LP; PASSOS, S; BACELLAR, O, *et al.* Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol.* 2007; 29: 251-258.

CARVALHO, LP; PASSOS, S; SCHRIEFER, A; CARVALHO, EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012; 3: 301.

CASTELLANO, LR; FILHO, DC; ARGIRO, L; DESSEIN, H; PRATA, A; DESSEIN, A; RODRIGUES, V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- $\gamma$  production. *Human Immunol.* 2009; 70: 383-390.

CHANDRA, D; NAIK, S. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol.* 2008; 154: 224-234.

CHANNON, J; ROBERTS, M; BLACKWELL, J. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunol.* 1984; 53: 345-355.

CHATELAIN, R; MAUZE, S; COFFMAN, RL. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunol.* 1999a; 21: 211-218.

COSTA-SILVA, M.F. Caracterização de biomarcadores imunológicos em pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea da comunidade indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil. *Tese (Doutorado em Ciências da Saúde na área de Concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias)* - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou - Belo Horizonte, 2013. Acessado em 20 de abril 2014.

COUTINHO, SG; DA-CRUZ, AM; BERTHO, AL; SANTIAGO, MA; DE-LUCA, P; Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998; 31: 139-142.

CUNNINGHAM, AC. Parasite adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp and Mol Pathol.* 2002; 72: 132-141.

DA-CRUZ, AM; BERTHO, AL; OLIVEIRA-NETO, MP; COUTINHO, SG. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Brit. J. Dermatol.* 2005; 153: 537-543.

DA-CRUZ, AM; CONCEIÇÃO-SILVA, F; BERTHO, AL; COUTINHO, SG. Leishmania-reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994. 62: 2614-2618.

DAVID, CV; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol and Therapy.* 2009; 22: 491-502

DE ASSIS SOUZA, M; BRELAZ-DE-CASTRO, MCA; OLIVEIRA, AP; DE ALMEIDA, AF; DE ALMEIDA, TM; REIS, LC; MEDEIROS, ACR; DE BRITO, MEF; PEREIRA, VRA. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microbial Pathogenesis.* 2013; 57: 27-32.

DE SOUZA LEAO, S; LANG, T; PRINA, E; HELLIO, R; ANTOINE, JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J of Cell Science.* 1995; 108: 3219-31.

DE-CAMPOS, SN; SOUZA-LEMONS, C; TEVA, A; PORROZZI, R; GRIMALDI, G JR. Systemic and compartmentalised immune responses in a *Leishmania braziliensis*-macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 137: 149-154.

DIAZ, NL; ARVELÁEZ, FA; ZERPA, O; TAPIA, FJ. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin and Exp Dermatol.* 2005; 31: 114-117.

DÍAZ, NL; FERNÁNDEZ, M; FIGUEIRA, E; RAMÍREZ, R; MONSALVE, IB; TAPIA, FJ. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2003; 28: 288-293.

DISCH, J; PEDRAS, MJ; ORSINI, M et al. *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 51: 185-90.

DORVAL, ME. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2009; 104: 695-702.

FARIA, DR; GOLLOB, KJ; BARBOSA, J JR; SCHRIEFER, A; MACHADO, PR; LESSA, H; CARVALHO, LP; ROMANO-SILVA, MA; DE JESUS, AR; CARVALHO, EM; DUTRA, WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun*. 2005; 73: 7853-7859.

FARIA, MS; REIS, FC; LIMA, AP. Toll-like receptors in *Leishmania* infections: guardians or promoters? *J Parasitol Res*. 2012.

FOLLADOR, I; ARAUJO, C; BACELLAR, O, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 54-58.

FORATTINI, OP. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1960; 2: 195-203.

FREITAS-TEIXEIRA, PM; SILVEIRA-LEMOS, D; GIUNCHETTI, RC, et al. Distinct pattern of immunophenotypic features of innate and adaptive immunity as a putative signature of clinical and laboratorial status of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol*. 2012; 76(4):421-432.

GALATI, EAB; NUNES, VLB; DORVAL, MEC; OSHIRO, ET; CRISTALDO, G; ESPÍNDOLA, MA et al. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1996; 30: 115–128.

GIUDICE, A; VENDRAME, C; BEZERRA, C; CARVALHO, LP, et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis*. 2012; 29: 12.

GIUDICE, A; CAMADA, I; LEOPOLDO, PTG; PEREIRA, JMB; RILEY, LW; WILSON, ME; HO, JL; RIBEIRO DE JESUS, A; CARVALHO, EM; ALMEIDA, RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis*. 2007; 7:7.

GOLLOB, KJ; ANTONELLI, LRV; FARIA, DR; KEESEN, TSL; DUTRA, WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4–CD8– (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: A balancing act between protection and pathology. *International Immunopharmacology*. 2008; 8: 1338-1343.

GOMES, JA; CAMPI-AZEVEDO, AC; TEIXEIRA-CARVALHO, A, et al. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. *Immunobiology*. 2012; 217(10): 1005-1016.

GOMES-SILVA, A; DE CÁSSIA BITTAR, R; DOS SANTOS NOGUEIRA, R; AMATO, VS; DA SILVA MATTOS, M; OLIVEIRA-NETO, MP; COUTINHO, SG; DA-CRUZ, AM. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol.* 2007; 149: 440-444.

GONTIJO, CMF; DA SILVA, ES; DE FUCCIO, MB; DE SOUSA, MCA; PACHECO, RS; DIAS, ES; ANDRADE-FILHO, JD; BRAZIL, RP; MELO, MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.* 2002; 81: 143-150.

GONZALEZ-LOMBANA, C; GIMBLET, C; BACELLAR, O; OLIVEIRA, WW; PASSOS, S; CARVALHO, LP; GOLDSCHMIDT, M; CARVALHO, EM; SCOTT, P. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog.* 2013; 9: e1003243.

GREEN, SJ; CRAWFORD, RM; HOCKMEYER, JT; MELTZER, MS; NACY, CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1990; 145: 4290-4297.

GREVELINK, SA; LERNER, EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* 1996; 34: 257-272. Review.

GRIMALDI JR, G; TESH, RB & MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *American J of Trop Med and Hyg.* 1989; 41: 687-725.

GRIMALDI, GJR. Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1982; 77: 195-215.

GUERRA, CS; SILVA, RM; CARVALHO, LO; CALABRESE, KS; BOZZA, PT; CÔRTE-REAL, S. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. *Int J Exp Pathol.* 2010; 91: 451-459.

GUTIERREZ, Y; SALINAS, GH; PALMA, G; VALDERRAMA, LB; SANTRICH, CV; SARAIVA, NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *American J Trop Med Hyg.* 1991; 45: 281-289.

HALSTEAD, SB; MAHALINGAM, S; MAROVICH, MA; UBOL, S; MOSSER, DM. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10: 712-22.

HAVENGA M J, VAN DAM B, GROOT B S, GRIMBERGEN J M, VALERIO D, BOUT A, QUAX P H. Simultaneous detection of NOS-3 protein expression and nitric oxide production using a flow cytometer. *Anal Biochemistry.* 2001; 290: 283-291.

HERWALDT, BL; BERMAN, JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *American J Trop Med Hyg.* 1992; 46: 296-306.

HORTA, MF; MENDES, BP; ROMA, EH; NORONHA, FS; MACÊDO, JP; OLIVEIRA, LS; DUARTE, MM; VIEIRA, LQ. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol Res.* 2012; 2012: 203818.

IBRAIM, IC; DE ASSIS, RR; PESSOA, NL; CAMPOS, MA; MELO, MN; TURCO, SJ; SOARES, RP. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasit Vectors.* 2013; 7;6:54.

JI, J; MASTERSON, J; SUN, J; SOONG, L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 2005; 174: 7147-7153.

KANE, MM & MOSSER, DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *The J of Immunol.* 2001; 166: 1141.

KAVOOSI, G; ARDESTANI, S; KARIMINIA, A; ABOLHASSANI, M; TURCO, S. *Leishmania major*: Reactive oxygen species and interferon gamma induction by soluble lipophosphoglycan of stationary phase promastigotes. *Exp Parasitol.* 2006; 114 (4): 323-328.

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

KAVOOSI, G; ARDESTANI, SK; KARIMINIA, A; ALIMOHAMMADIAN, MH. *Leishmania major* lipophosphoglycan: Discrepancy in toll-like receptor signaling. *Exp Parasitol.* 2010; 124: 214-218.

KAWA, H; SABROZA, PC; OLIVEIRA, RM; BARCELLOS, C. Production of transmission foci for cutaneous leishmaniasis: the case of Pau da Fome, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Publica.* 2010; 26: 1495-1507.

KEESEN, TSL; ANTONELLI, LRV; FARIA, DR; GUIMARÃES, LH; BACELLAR, O; CARVALHO, EM; DUTRA, WO; GOLLOB, KJ. CD4+ T cells defined by their Vb T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. *Clin and Exp Immunol.* 2011; 165: 338–351.

KIMA, PE; CONSTANT, SL; HANNUM, L; COLMENARES, M; LEE, KS; HABERMAN, AM; SHLOMCHIK, MJ; MCMAHON-PRATT, D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 2000; 191: 1063-1068.

KOBAYASHI, SD and DELEO, FR. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2009; 1: 309–333.

KOCYIGIT, A; GUR, S; GUREL, MS; BULUT, V; ULUKANLIGIL, M. Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Infect and Immunity*. 2002. 70: 6589-6591.

KOJIMA H, SAKURAI K, KIKUCHI K, KAWAHARA S, KIRINO Y, NAGOSHI H, HIRATA Y, NAGANO T. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1998; 46: 373-375.

KÖRNER, H; MCMORRAN, B; SCHLÜTER, D; FROMM, P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. *Int J Parasitol*. 2010; 40: 879-888. Review.

KÖRNER, H; SEDGWICK, JD. Tumour necrosis factor and lymphotoxin: molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity. *Immunol Cell Biol*. 1996; 74: 465-472. Review.

LAINSON, R; SHAW, JJ. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis. *Academic Press Inc*. 1987; 1-20.

LAUNOIS, P; OHTEKI, T; SWIHART, K; MACDONALD, HR; LOUIS, JA. In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1-. *Eur J Immunol*. 1995; 25: 3298-3307.

LIMA, HC; VASCONCELOS, AW; DAVID, JR, *et al*. American cutaneous leishmaniasis: *in situ* characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 50: 743-7.

LOCKSLEY, RM; HEINZEL, FP; SADICK, MD; HOLADAY, BJ; GARDNER, KD JR. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol*. 1987; 138: 744-9.

LOCKSLEY, RM; SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunol Today*. 1991; 12: 58-61.

LORENZ, E; MIRA, JP; FREES, KL; SCHWARTZ, DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*. 2002; 162: 1028-1032.

MAGALHÃES, AV; MORAES, MAP; RAICK, AN. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev do Inst de Med Trop de São Paulo*. 1986; 28: 253-62.

MALLINSON, D; COOMBS, G. Interaction of leishmania metacyclics with macrophages. *Int J Parasitol*. 1989; 19: 647-656.

MARQUES, MJ; VOLPINI, AC; MACHADO-COELHO, GL, *et al*. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 54: 37-43.

MARZOCHI, MCA. & MARZOCHI, KBF. Proposta de uma classificação clínica simplificada para as leishmanioses tegumentares do novo mundo. *Rev da Soc Brasileira de Med Trop.* 1994; 27 (supl. 1): 91.

MAYRINK, W; WILLIAMS, P; COELHO, MV; DIAS, M; MARTINS, AV; MAGALHÃES, PA *et al.* Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol.* 1979; 73: 123-137.

MENDONÇA, MG; DE BRITO, ME; RODRIGUES, EH; BANDEIRA, V; JARDIM, ML; ABATH, FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis.* 2004; 189: 1018-23.

MILES, SA; CONRAD, SM; ALVES, RG; JERONIMO, SM; MOSSER, DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J of Exp Med.* 2005; 201: 747-54.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, Diagnóstico Clínico e diferencial, primeira edição. Brasília-DF, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, segunda edição. Brasília-DF, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/Ita/bases/ltabrnet.def>> Acesso em: 20 de março de 2014.

MOCKENHAUPT, FP; CRAMER, JP; HAMANN, L; STEGEMANN, MS; ECKERT, J; OH, NR; OTCHWEMAH, RN; DIETZ, E; EHRHARDT, S; SCHRÖDER, NW; BIENZLE, U; SCHUMANN, RR. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 177-182.

MOSSER, DM; ROSENTHAL, LA. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cel Biol.* 1993; 4: 315-22.

NOLAN, A; KOBAYASHI, H; NAVEED, B; KELLY, A; HOSHINO, Y; HOSHINO, S; KARULF, MR; ROM, WN; WEIDEN, MD; GOLD, JA. Differential role for CD80 and CD86 in the regulation of the innate immune response in murine polymicrobial sepsis. *PLoS One.* 2009; 12:4(8):e6600.

NOVAIS, FO; NGUYEN, BA T; BEITING, DP; CARVALHO, LP; GLENNIE, ND; PASSOS, S; CARVALHO, EM; SCOTT, P. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by Reactive Oxygen Species. *The J of Infect Dis.* 2014; 209: 1288-1296.

NOVOA, R; BACELLAR, O; NASCIMENTO, M; CARDOSO, TM; RAMASAWMY, R; OLIVEIRA, WN; SCHRIEFER, A; CARVALHO, EM. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. *Parasite Immunol.* 2011; 33: 132-136.



- NYLÉN, S; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 2007; 28: 378-384. Review.
- OLIVEIRA, CR; PEREIRA, LIA; PEREIRA, A-JCS; FERREIRA, AA; CRESPO, AMC; SILVEIRA, LA. Allelic polymorphism of human FcγRIIA-HR131 receptor in American tegumentary leishmaniasis. *Internat J of Immunogenetics.* 2011a; 38: 225–231.
- OLIVEIRA, F; BAFICA, A; ROSATO, AB; FAVALI, CB; COSTA, JM; CAFÉ, V; BARRAL-NETTO, M; BARRAL, A. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2011b; 85: 70-73.
- OLIVEIRA, MC; AMORIM, RF; FREITAS, RDEA; COSTA, ADEL. A fatal case of mucocutaneous leishmaniasis after pentavalent antimonial use. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38: 258-60.
- OLIVEIRA-NETO, MP; MATTOS, M; PIRMEZ C, *et al.* Mucosal leishmaniasis ("espundia") responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime®) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000; 42: 321-5.
- O'NEILL, LA; BOWIE, AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 353-364. Review.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Epidemiology and control of Leishmaniasis. Technical Report Series. Geneva: WHO; 2010.
- OZBILGE, H; AKSOY, N; GUREL, MS; YAZAR, S. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. *J Med Microbiol.* 2006; 55: 1329-1331.
- PASSOS, VM; FALCÃO, AL; MARZOCHI, MC; GONTIJO, CM; DIAS, ES; BARBOSA-SANTOS, EG; GUERRA, HL; KATZ, N. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993; 88: 103-110.
- PASSOS, VMA; FALCÃO, AL; MARZOCHI, MCA; GONTIJO, CMF; DIAS, ES; KATZ, N. Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban área of Belo Horizonte, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993; 88: 103-110.
- PEARSON, RD; SOUSA, AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1996; 22: 1-13. Review.
- PENTCHEVA-HOANG, T; EGEN, JG; WOJNOONSKI, K; ALLISON, JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity.* 2004; 21(3): 401-13.
- PETERS, C; AEBISCHER, T; STIERHOF, YD; FUCHS, M; OVERATH, P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci.* 1995; 108: 3715-3724.

PHAM, N-K; MOURIZ, J; KIMA, P. *Leishmania pifanoi* a amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. *Infect Immun*. 2005; 73: 8322-8333.

PINTO-DA-SILVA, LH; CAMURATE, M; COSTA, KA; OLIVEIRA, SMP; CUNHA-E-SILVA, NL; SARAIVA, EMB. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. *International Journal for Parasitology*. 2002; 32: 1371–1377.

PIRMEZ, C; COOPER, C; PAES-OLIVEIRA, M, *et al*. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol*. 1990; 145: 3100–4.

PIRMEZ, C; DA SILVA TRAJANO, V; PAES-OLIVEIRA NETO, M, *et al*. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1819-23.

PITTA, MG; ROMANO, A; CABANTOUS, S; HENRI, S; HAMMAD, A; KOURIBA, B; ARGIRO, L; EL KHEIR, M; BUCHETON, B; MARY, C; EL-SAFI, SH; DESSEIN, A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest*. 2009; 119: 2379-2387.

QADOUMI, M; BECKER, I; DONHAUSER, N; RÖLLINGHOFF, M; BOGDAN, C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 2002; 70: 4638-4642.

QUARESMA, PF. Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores. *Tese (Doutorado em Ciências da Saúde na área de Concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias)* - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou - Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/5505>. Acessado em 25 de fevereiro 2014.

REVETCH, J; KINET, JP. Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol*. 1991; 9:457.

RAVETCH, J; ADEREM, A. Phagocytic cells. *Immunol Rev*. 2007; 219: 5-7.

REIS, LC; BRITO, MEF; SOUZA, MA; MEDEIROS, ACR; SILVA, CJ; LUNA, CF; PEREIRA, VRA. Cellular Immune Response Profile in Patients With American Tegumentary Leishmaniasis Prior and Post Chemotherapy Treatment. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2009; 23: 63–69.

RIBEIRO-DE-JESUS, A; ALMEIDA, RP; LESSA, H; BACELLAR, O; CARVALHO, EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Research*. 1998; 31: 143-148.

RIDLEY, MJ; RIDLEY, DS. Cutaneous leishmaniasis: immune complex formation and necrosis in the acute phase. *Br J Exp Pathol*. 1984; 65: 327–36.

ROCHA, PN; ALMEIDA, RP; BACELLAR, O, *et al*. Down-regulation of Th1 type response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infec Dis*. 1999; 180: 1731-1734.

ROMERO, GA; SAMPAIO, RN; MACEDO, VDEO; MARSDEN, PD. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94: 505-8.

SACKS, D; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 845-858.

SACKS, DL; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Ver Immunol*. 2002; 2: 845-858.

SALAZAR-SUAZO, N; VOLKOW, P; TAMAYO, RP; MOLL, H; GILLITZER, R; PÉREZ-TORRES, A; PÉREZ-MONTFORT, R; DOMÍNGUEZ, JD; VELASCO-CASTREJÓN, O; CRIPPA, M; BECKER, I. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Internat Health*. 1999; 4: 801-811.

SALHI, A; RODRIGUES, V JR; SANTORO, F; DESSEIN, H; ROMANO, A; CASTELLANO, LR; SERTORIO, M; RAFATI, S; CHEVILLARD, C; PRATA, A; ALCAÏS, A; ARGIRO, L; DESSEIN, A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol*. 2008; 180: 6139-6148.

SAMPAIO, RN; DE PAULA, CD; SAMPAIO, JH, et al. The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of pentavalent antimony administered in a dose of 40 mg Sb V/kg/day, 12/12 hr, for 30 days in the mucocutaneous form of leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997; 30: 457-63.

SANTANA, GMS. Uso da citometria de fluxo para identificar marcadores biológicos e alvos terapêuticos da leishmaniose cutânea humana. Tese - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Salvador, 2007. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe>. Acessado em 25 de março, 2014.

SARAIVA, BEM; PIMENTA, PFP; BRODIN, TN; ROWTON, E; MODI, GD; SACKS, DL. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitol*1995; 111: 275-287.

SCHACHNIK, NCC; DUSSE, LMS; MARTINS-FILHO, OAO; PERUHYPE-MAGALHÃES, VP. Uso da citometria de fluxo para análise de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com nefropatia crônica do enxerto. *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais*. 2008.

SCOTT, P; NATOVITZ, P; COFFMAN, RL; PEARCE, E; 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. *J Exp Med*. 1988; 168: 1675-1684.

SES-MG. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br> Acessado em 14 de maio de 2014.

SHIMABUKURO, PHF; SILVA, TRR; RIBEIRO, FOF; BATON, LA; GALATI, EAB. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors*. 2010; 3: 121.

SILVEIRA, FT; LAINSON, R; CORBETT, CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99: 239-51.

SINGH, RK; SRIVASTAVA, A; SINGH, N. Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiol Res*. 2012; 167: 445-451. Review.

SNYDER, SH; BREDT, DS. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*. 1992; 266: 28-35.

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: 36-39.

SOUSA-ATTA, ML; SALAMÉ, GS; D'OLIVEIRA, AJR; ALMEIDA, RP; ATTA, AM; CARVALHO, EM. Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. *Clin and Diag Lab Immunol*. 2002; 9: 101-104.

SOUZA, MA; CASTRO, MCAB; OLIVEIRA, AP; ALMEIDA, AF; REIS, LC; SILVA, CJ; BRITO, MEF; PEREIRA, VRA. American Tegumentary Leishmaniasis: Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Clinical Cure, With or Without Chemotherapy. *Scand J of Immunol*. 2012; 175-180.

SOUZA, MA; SILVA, AG; AFONSO-CARDOSO, SR; FAVORETO JUNIOR, SE; FERREIRA, MS. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in american tegumentary leishmaniasis. *Rev da Soc Bras de Med Trop*. 2005; 38(2):137-141.

STENGER, S; THÜRING, H; RÖLLINGHOFF, M; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med*. 1994; 180: 783-793.

STRIJDOM H, MULLER C, LOCHNER A. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *J of Mol and Cell Cardiology*. 2004; 37: 897-902.

SUTTERWALA, FS; NOEL, GJ; SALGAME, P; MOSSER, DM. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcγ receptor type I. *J of Exp Med*. 1998; 188: 217-22.

TUON, FF; AMATO, VS; BACHA, HA; ALMUSAWI, T; DUARTE, MI; AMATO NETO, V. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun*. 2008; 76: 866-872. Review.

TUON, FF; FERNANDES, ER; DUARTE, MI; AMATO, VS. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2012 May-Jun;54(3):159-63.

VIEIRA, ÉL; KEESEN, TS; MACHADO, PR; GUIMARÃES, LH; CARVALHO, EM; DUTRA, WO; GOLLOB, KJ. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunol.* 2013; 35(2): 65-72.

VIEIRA, MG; OLIVEIRA, F; ARRUDA, S *et al.* B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: 979-983.

VOULDOUKIS, I; RIVEROS-MORENO, V; DUGAS, B; OUAZ, FA; BECHERAL, P; DEBRE, P; MONCADA, P; MOSSALAYI, MD. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcεRII/CD23 surface. *Proceed of the Nat Acad of Sciences.* 1995; 92: 7804-7808.

VOULDOUKIS, I; ISSALY, F; FOURCADE, C; PAUL-EUGÈNE, N; AROCK, M; KOLB, JP; DA SILVA, OA; MONJOUR, L; POINSOT, H; TSELENTIS, Y. CD23 and IgE expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis: possible role in monocyte activation. *Research in Immunol.* 1994; 145: 17-27.

WALTON, BC; CHINEL, LV; EGUIA, Y; EGUIA, O. Onset of espundia after many years of occult infection with *Leishmania braziliensis*. *The Am J Trop Med and Hyg.* 1973; 22: 696-698.

WATFORD, WT; MORIGUCHI, M; MORINOBU, A; O'SHEA, JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2003; 14: 361-368.

WEIGLE, K AND SARAVIA, N.G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1996; 14: 433-450.

WHO – World Health Organization. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/disease epidemiology/en/print.html](http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/print.html)> Acessado em 25 de fevereiro de 2014.

WILSON, ME; JERONIMO, SMB; PEARSON, RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathology.* 2005; 38: 147-160.

WOELBING, F; KOSTKA, SL; MOELLE, K; BELKAID, Y; SUNDERKOETTER, C; VERBEEK, S. *et al.* Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcε receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *The J of Exp Med.* 2006; 203: 177.

ZANDBERGEN, GV; KLINGER, M; MUELLER, A; DANNENBERG, S; GEBERT, A; SOLBACH, W; LASKAY, T. Cutting Edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J of Immunol.* 2004; 173: 6521-6525.