

AGOSTINHO GONÇALVES VIANA

Estudo das características funcionais de monócitos humanos infectados *in vitro* com diferentes cepas de *Leishmania* e análise da expressão dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs) em linfócitos de indivíduos portadores de leishmaniose tegumentar americana

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2016

AGOSTINHO GONÇALVES VIANA

Estudo das características funcionais de monócitos humanos infectados *in vitro* com diferentes cepas de *Leishmania* e análise da expressão dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs) em linfócitos de indivíduos portadores de leishmaniose tegumentar

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Walderez Ornelas Dutra
Coorientador: Dr. Kenneth John Gollob

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2016



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

AGOSTINHO GONÇALVES VIANA

154/2016
entrada
1º/2012
2012664908

Às treze horas do dia 29 de fevereiro de 2016, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DE MONÓCITOS HUMANOS INFECTADOS IN VITRO COM DIFERENTES CEPAS DE LEISHMANIA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS TRANSDUTORES DE SINAL E ATIVADORES DE TRANSCRIÇÃO (STATS) EM LINFÓCITOS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Walderez Ornelas Dutra**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Walderez Ornelas Dutra	UFMG	Aprovado
Dr. Kenneth John Gollob	INSTITUTO MARIO PENNA	Aprovado
Dra. Fátima Noronha	UFMG	Aprovado
Dra. Denise da Silveira Lemos Giunchetti	FIOCRUZ	Aprovado
Dra. Soraya Torres Gaze	RENE RANCHOU	Aprovado
Dr. Ricardo Gonçalves	UFMG	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovado

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 29 de fevereiro de 2016.**

Dra. Walderez Ornelas Dutra (Orientadora) _____

Dr. Kenneth John Gollob (Co-orientador) _____

Dra. Fátima Noronha _____

Dra. Denise da Silveira Lemos Giunchetti _____

Dra. Soraya Torres Gaze _____

Dr. Ricardo Gonçalves _____

Auristina Guatimarin Fonseca
Prof. Cristina Guatimarin Fonseca
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB / UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Biologia das Interações Celulares do ICB-UFMG do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação dos professores Dra. Walderez Ornelas Dutra e Dr. Kenneth John Gollob.

Agências financiadoras:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais – INCT-DT/CNPq
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado à vida, a esperança, confiança, sabedoria, pois sem estas jamais poderia vencer mais esta batalha.

Agradeço aos meus pais, pelo apoio em toda a minha vida, pois sem eles nunca teria alcançado meus objetivos, meus sinceros agradecimentos ao meu pai Antônio Viana e minha mãe Nailta Viana.

Aos meus irmãos Mônica, Rita e Antonio Geraldo, por todo o carinho, paciência e principalmente pelo incentivo. E agradeço também, aos seus respectivos cônjuges, Paulo Henrique, Dim e Paula.

A minha namorada Luciana Fonseca, que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis, principalmente, pela paciência nessa reta final desse percurso.

Aos mestres presentes no laboratório, que sempre de alguma forma me deram apoio nessa vida acadêmica, Micena, Paula Rocha, Juliana Estanislau e Rodolfo Giunchetti.

A Luísa Magalhães, muito obrigado pelos ensinamentos nos primeiros experimentos no laboratório e as ajudas sempre necessárias.

A Carolina Koh, pelas palavras sempre sinceras, mas que sempre me ajudaram a repensar em alguma coisa seja nos experimentos ou em outros assuntos da vida.

Aos colegas de laboratório de Biologia das Interações Celulares onde tive a oportunidade de adquirir conhecimentos, em especial Livia Passos, Rafael Mattos, Thais Eloi, Maurício Azevedo, Simone Amormino, Amanda Wardini, Kelvinson Viana,

Nayara Ingrid, Rita Santanna, Ludmila Zanandreis, Marina Rodrigues, Otoni Melo, Luiz Rocha, Luiza Guerra, Elaine Monteiro, Jaqueline, enfim, todos que me ajudaram direta ou indiretamente a conquista de mais uma etapa.

Ao meu amigo Leandro Teles, que sempre esteve disposto a me ouvir reclamando que estava difícil essa fase de doutorado, hahaha! A Marina Andrade, por sempre me apoiar indiretamente.

Aos colegas das disciplinas do programa de pós-graduação em Biologia Celular.

Agradeço também a CAPES pelo apoio a pesquisa.

E agradeço, principalmente, aos meus “pais científicos”, Kenneth Gollob e Walderez Dutra, por todas as oportunidades e confiança ao longo de todo o percurso e pelos ensinamentos compartilhados que me ajudaram a conduzir esta tese. Agradeço muito pela oportunidade!

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram na minha vida acadêmica, e juntos vencemos mais esta batalha.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos gerais da leishmaniose	16
1.3 Manifestações clínicas e aspectos gerais da resposta imune das leishmanioses	21
1.4 Mecanismos de interação macrófago/ <i>Leishmania</i>	22
1.5 Aspectos gerais dos linfócitos T na leishmaniose	26
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
2.2.1 Objetivos específicos 1ª parte:	30
2.2.2 Objetivos específicos 2ª parte:	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Metodologia referente à 1ª parte dos objetivos	32
3.1.1 Parasitos e cultura de <i>Leishmania</i>	32
3.1.2 Curva de crescimento dos parasitos	32
3.1.3 Doadores	33
3.1.4 Purificação de células mononucleares do sangue periférico	33
3.1.5 Infecção das CMSP com diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	33
3.1.6 Marcação das moléculas de superfície e intracelular em monócitos provenientes de CMSP infectadas <i>in vitro</i> por diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	34
3.1.7 Estratégia de análises de monócitos e linfócitos infectados <i>in vitro</i> com diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	36
3.1.8 Ensaio controle de infecção por diluição limitante	36
3.1.9 Análises estatísticas.....	37
3.2.1 Pacientes e controles	39
3.2.2 Preparo do antígeno.....	40
3.2.3 Marcação de moléculas de superfície e STATs	40
3.2.4 Análises dos dados obtidos no citômetro de fluxo	41
3.2.5 Análise estatística.....	41
4. RESULTADOS.....	43
4.1 Resultados referentes à 1ª parte dos objetivos.....	43
4.1.2 Curva de crescimento dos parasitos	43
4.1.3 Infecção <i>in vitro</i>	43

4.1.4	Análise da infecciosidade das subpopulações de monócitos pelas diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	44
4.1.4	Análise da expressão do marcador CD14 em monócitos infectados com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	47
4.1.5	Avaliação da expressão de TLR 2 e TLR 9 em monócitos infectados com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	48
4.1.6	Análise da expressão da molécula de ativação HLA-DR em monócitos CD14 infectados com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	51
4.1.7	Avaliação da expressão das moléculas co-estimuladoras em monócitos infectados com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	53
4.1.8	Avaliação da expressão intracelular de citocinas em monócitos infectados com diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	57
4.1.9	Correlações entre a expressão de TLR e a expressão de citocinas por monócitos infectados com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	62
4.1.10	Comparação da intensidade de expressão das diferentes moléculas entre as subpopulações de monócitos CD14 ⁺ e CD14 ⁻ infectados com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	63
4.1.11	Avaliação do controle de infecção em monócitos infectados com diferentes cepas de <i>Leishmania</i> submetidos a diluição limitante	65
4.1.12	Avaliação da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando moléculas de ativação e citocinas.....	66
4.2	Resultados referentes à 2ª parte dos objetivos.....	71
4.2.1	Expressão de pSTATs na população de linfócito total em cultura não estimulada e estimulada com SLA	71
4.2.2	Análise das pSTATs nas subpopulações de linfócitos virgens e de memória em cultura não estimulada ou estimulada com SLA	73
5.	DISCUSSÃO.....	77
6.	RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS.....	89
7.	CONCLUSÃO	91
	Conclusão da 1ª parte	91
	Conclusão da 2ª parte	91
8.	REFERÊNCIAS	92
9.	ANEXOS.....	99
	Anexo 1	100
	Anexo 2	131
	Anexo 3	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida da <i>Leishmania infantum</i>	17
Figura 2: Figura 2: Gráfico de dispersão puntual e histograma representativos da estratégia de análise de monócitos e linfócitos.	38
Figura 3: Gráfico de dispersão puntual e histograma representativos da estratégia de análise em linfócitos.	42
Figura 4: Curva de crescimento das promastigotas das cepas de <i>Leishmania chagasi</i> e <i>Leishmania braziliensis</i>	43
Figura 5: Gráficos representativos de dispersão puntual em tamanho <i>versus</i> granuloseidade da análise da cultura de <i>Leishmania</i>	44
Figura 6: Estratégia de seleção de população e determinação da intensidade de infecção de monócitos derivados de CMSP utilizando parasitos marcados com CFSE.....	45
Figura 7: Determinação da frequência de monócitos infectados por diferentes cepas de <i>Leishmania</i> após 4 horas e 16 horas de cultura.....	46
Figura 8: Análise da expressão de CD14 em monócitos infectados ou não com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i> com 4 horas e 16 horas após a infecção.	47
Figura 9: Avaliação da intensidade média de fluorescência de expressão de TLR2 em monócitos CD14 ⁻ e CD14 ⁺ infectados ou não com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	49
Figura 10: Avaliação da intensidade média de fluorescência de expressão de TLR9 em monócitos CD14 ⁻ e CD14 ⁺ infectados ou não com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	50
Figura 11: Avaliação da intensidade média de fluorescência da expressão da molécula de ativação HLA-DR em monócitos CD14 ⁻ e CD14 ⁺ infectados ou não com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	52
Figura 12: Avaliação da expressão da molécula co-estimuladora CD80 em monócitos infectados ou não com diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	54
Figura 13: Avaliação da expressão da molécula co-estimuladora CD86 em monócitos infectados ou não com diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	56
Figura 14: Avaliação da frequência de monócitos infectados ou não com diferentes cepas de <i>Leishmania</i> expressando IL-12/IL-23p40	58
Figura 15: Avaliação da frequência de monócitos infectados ou não com diferentes cepas de <i>Leishmania</i> expressando TNF- α	59

Figura 16: Avaliação da frequência de monócitos infectados ou não com diferentes cepas de <i>Leishmania</i> expressando IL-10.....	60
Figura 17: Razão da expressão de TNF- α /IL-10 em monócitos infectados com diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	61
Figura 18: Análise de correlação entre a expressão de TLR2 e TLR9 com TNF- α em monócitos CD14 ⁻ e CD14 ⁺ infectados com diferentes isolados de <i>Leishmania</i>	63
Figura 19: Frequência de linfócitos CD8 ⁺ expressando CD69 em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	66
Figura 20: Avaliação da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando CTLA-4 em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	67
Figura 21: Avaliação da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando TNF- α em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	67
Figura 22: Avaliação da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando IFN- γ em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	68
Figura 23: Avaliação da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando IL-17 em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	69
Figura 24: Avaliação da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando IL-10 em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	69
Figura 25: Avaliação da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando Granzima A em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	70
Figura 26: Intensidade média de fluorescência de pSTATs na população de linfócitos totais.....	72
Figura 27: Avaliação da frequência de linfócitos expressando pSTAT-3 em indivíduos não infectados e pacientes com LC submetidos a cultura meio e SLA.....	74
Figura 28: Avaliação da frequência de linfócitos expressando pSTAT-5 em indivíduos não infectados e pacientes com LC submetidos a cultura meio e SLA.....	75
Figura 29: A área de reação do teste de Montenegro está correlacionada com a frequência de linfócitos expressando pSTATs.....	76
Figura 30: Esquema representativo dos resultados encontrados em monócitos e linfócitos infectados pelas diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	89
Figura 31: Esquema representativo dos resultados encontrados em linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea.....	90

LISTA DE ABREVIACES

μg - Micrograma

μL - Microlitros

μm - Micrmetros

mL - mililitros

mg - miligramas

$^{\circ}\text{C}$ - Grau centígrado

APC - Células apresentadora de antígeno

CD - Grupo de diferenciação (cluster of differentiation)

CFDASE – 5-(e-6)-carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester

CMSP - Células mononucleares do sangue periférico

CTLA-4 - Antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico

DC - Células dendríticas

DNA - cido desoxirribonucléico

EDTA cido etileno diamino tetraacético

FITC - Isocianato de fluoresceína

FACS - Fluorecence Acitivated Cell Sorter

FSC - Forward Angle Light Scatter

Gp63- Glicoproteína 63

HLA-DR - Antígeno Leucocitário Humano

IFN - Interferon

IL - Interleucina

IMF - Intensidade Média de Fluorescência

iNOS - óxido nítrico sintase indutível

Lb – *Leishmania braziliensis*

Lc – *Leishmania chagasi*

LC - Leishmaniose cutânea

LD – Leishmaniose difusa

LM - Leishmaniose mucocutânea

LPG - Lipofosfoglicano

LV - Leishmaniose visceral

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MST – Teste de Montenegro

NF- κ B - Fator nuclear kapa B

NK - Células matadoras naturais (natural killer)

NO - Óxido nítrico

PAMP - Padrões moleculares associados à patógenos

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

RNA - Ácido ribonucléico

ROS - Espécies reativas ao oxigênio

RPM Rotações por minuto

SSC - Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)

SLA – Antígeno solúvel de *Leishmania*

STAT - Transdutores de sinal e ativadores de transcrição

TCR - Receptor de Célula T

TGF- β - Fator de Crescimento Tumoral-beta

Th - Linfócito auxiliar (T helper)

Th1 - Resposta celular do tipo 1

Th2 - Resposta celular do tipo 2

TLR - Receptor do tipo Toll

TNF- α Fator de necrose tumoral - alpha

RESUMO

A infecção humana com diferentes espécies de *Leishmania* leva a distintas manifestações clínicas, variando entre as formas clínicas cutânea (*L. braziliensis*) e visceral (*L. infantum chagasi*). Essas manifestações clínicas tem sido correlacionadas com diferentes características da resposta imunológica dos indivíduos que, embora bastante estudada, não está completamente elucidada. Nosso trabalho tem como hipótese que a infecção de monócitos por diferentes cepas de *Leishmania* leva a uma expressão diferencial de moléculas associadas à ativação celular e de expressão de citocinas e que presença de diferentes citocinas no microambiente leva a alterações na cascata de sinalização intracelular, que pode estar associadas com a evolução clínica dos pacientes. Primeiramente, foi avaliada a expressão de moléculas de ativação e expressão de citocinas em células mononucleares do sangue periférico infectadas *in vitro* com *L. braziliensis* (2904), uma cepa de referência de *L. chagasi* (BH46) e uma cepa selvagem de *L. chagasi*. Estes estudos mostraram que a indução de TLR2, TLR9 e HLA-DR foi mais baixa em monócitos infectados com *L. chagasi* comparando-se com *L. braziliensis*. Ademais, monócitos infectados com ambas as cepas de *L. chagasi* tiveram uma menor expressão de TNF- α e uma menor razão TNF- α /IL-10, resultando em uma diminuição do perfil inflamatório. Além disso, os monócitos infectados com *L. chagasi* foram 100 vezes menos eficaz no controle de *Leishmania* do que as células infectadas com *L. braziliensis*. Avaliando-se a expressão de moléculas de ativação e de citocinas pelos linfócitos T citotóxicos provenientes das mesmas culturas infectadas com as diferentes espécies de *Leishmania*, observou-se que a infecção com *L. chagasi* levou a uma diminuição na expressão de IFN- γ e IL-17 comparando-se com *L. braziliensis*. De maneira interessante, a infecção com a cepa *Lc* BH46 levou a um aumento na expressão da molécula inibidora CTLA-4 em linfócitos e a infecção por essa mesma cepa, induziu o aumento de CD80 em monócitos. A infecção pela *L. braziliensis* induziu um perfil mais inflamatório em linfócitos T CD8⁺ dado pela maior expressão de IFN- γ e IL-17, e também, da molécula citotóxica granzima A, quando comparado com a infecção pelas cepas de *L. chagasi*. Nossos resultados mostram que *L. chagasi* não induz uma forte resposta inflamatória, por levar a uma menor ativação nos monócitos e linfócitos humanos, comparando-se com a infecção pela *L. braziliensis*. Este perfil funcional pode ajudar a explicar o distinto curso clínico observado em pacientes infectados com diferentes espécies de *Leishmania*. Posteriormente, propusemo-nos a estudar a resposta celular para as citocinas, através da análise da expressão das moléculas fosfo-STATs em pacientes com leishmaniose cutânea. Nossos resultados mostraram um papel ativo de STATs em um ambiente inflamatório com um aumento da expressão de fosfo-STATs relacionadas à inflamação (STAT-5), principalmente em células de pacientes com leishmaniose cutânea estimuladas com antígeno de *Leishmania*. Além disso, houve uma diminuição na fosfo-STAT relacionada a um ambiente antiinflamatório induzida por IL-10 (STAT-3). Estes dados são compatíveis com o ambiente inflamatório observado durante a leishmaniose cutânea e indicam uma resposta ativa às citocinas inflamatórias, enquanto que, embora a IL-10 esteja presente, a resposta a esta citocina está diminuída.

ABSTRACT

Human infection with different *Leishmania* species leads to different clinical manifestations and clinical forms varying between the involvement of skin (*L. braziliensis*) and visceralization (*L. infantum chagasi*). These clinical manifestations have been related to different characteristics of the immune response of individuals who, while well studied, are not completely understood. Our work has hypothesized that infection of monocytes by different strains of *Leishmania* leads to differential expression of molecules associated with cellular activation and expression of cytokines, and that the presence of different cytokines in the microenvironment leads to changes in intracellular signaling cascades associated with clinical outcome. First, the expression of activation molecules and cytokine expression in infected peripheral blood mononuclear cells was evaluated in vitro with *L. braziliensis* (2904), a reference strain of *L. chagasi* (BH46) and a wild type strain of *L. chagasi*. These studies showed that the induction of TLR2, TLR9 and HLA-DR was lower in monocytes infected with *L. chagasi* compared with *L. braziliensis*. In addition, monocytes infected with the *L. chagasi* strains had a lower expression of TNF- α , and a lower ratio TNF- α /IL-10, resulting in a decrease in the inflammatory profile. Moreover, monocytes infected with *L. chagasi* were a 100 fold less effective at controlling *Leishmania* than cells infected with *L. braziliensis*. Evaluating the expression of activation molecules and cytokines by CD8⁺ T lymphocytes from the same cultures infected with the different *Leishmania* species, it was observed that infection with *L. chagasi* led to a decrease in the expression of IFN- γ and IL-17 comparing with *L. braziliensis*. Interestingly, the infection with strain *L. chagasi* BH46 led to an increase in the expression of the inhibitory molecule CTLA-4 on lymphocytes and infection by the same strain induced an increase of CD80 on monocytes. The *L. braziliensis* infection induced a more inflammatory profile in CD8⁺ T cells as seen by the increased expression of IFN- γ and IL-17, and also the cytotoxic molecule granzyme A, compared with infection by *L. chagasi* strains. Our results show that *L. chagasi* infection fails to induce a strong inflammatory response, as well as leads to less activation in monocytes and human lymphocytes, as compared to infection by *L. braziliensis*. This functional profile may help explain the different clinical outcome observed in patients infected with different species of *Leishmania*. Subsequently, we proposed to study the cellular response to cytokines through the analysis of the expression of phospho-STAT molecules in patients with cutaneous leishmaniasis. Our results showed an active role for STATs in an inflammatory environment with an increased expression of phospho-related inflammatory STATs (STAT-5), particularly in cells from patients with cutaneous leishmaniasis stimulated with *Leishmania* antigen. Furthermore, there was a decrease in the phospho-STAT related to an anti-inflammatory environment induced by IL-10 (STAT-3). These data are consistent with the observation that the environment seen in cutaneous leishmaniasis, indicates an active response by inflammatory cytokines, and that while IL-10 is present, its activity is decreased.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da leishmaniose

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários de várias espécies do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) e são consideradas um grave problema de saúde pública (Who, 2010). O gênero, *Leishmania*, pode causar no homem um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam desde lesões de pele localizadas até lesões disseminadas nas mucosas ou em diferentes órgãos. As formas de leishmaniose, no Brasil, concentram-se em dois grandes grupos clínicos: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (Marzochi & Marzochi 1994).

A Organização Mundial de Saúde estima que, atualmente, há 12 milhões de pessoas com leishmanioses e que ocorrem 1,3 milhões de novos casos a cada ano, sendo que 1 milhão são de leishmaniose cutânea (Who 2010). O Brasil figura entre os seis países (Bangladesh, Índia, Etiópia, Nepal, Sudão e Brasil) que relatam mais de 90% dos casos de LV e entre os seis (Irã, Colômbia, Algéria, Afeganistão, Síria e Brasil) com 90% dos casos de LT no mundo (Who, 2010).

O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitos com ciclo de vida digenético (heteroxênico) que vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores (Figura 1). Nos hospedeiros vertebrados, representados na natureza por várias espécies de mamíferos, os parasitos assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, multiplicando-se por fissão binária dentro de células do sistema monocítico fagocitário. Após a multiplicação das formas amastigotas, os macrófagos se rompem, liberando parasitos que podem ser fagocitados por outros macrófagos (Gontijo & De Carvalho, 2003). Todas as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas pertencentes à subfamília Phlebotominae, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (França, 1924) (Soares & Turco, 2003; Dias et al. 2007).

Nos flebotomíneos, o parasito *Leishmania* vive no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Neste local, as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas (promastigotas) morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas. Posteriormente, os parasitos se transformam em promastigotas metacíclicas, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado

(Gontijo & De Carvalho, 2003). Para que a *Leishmania* possa garantir tanto a sua sobrevivência quanto a sua capacidade de multiplicação dentro de um ambiente hostil, o parasito expressa moléculas de superfícies que auxiliarão de diferentes formas nesse processo. Esse ambiente extremamente adverso é representado pelo interior de células fagocíticas do hospedeiro vertebrado, bem como pela parte interna do intestino do hospedeiro invertebrado (De Assis et al., 2012).

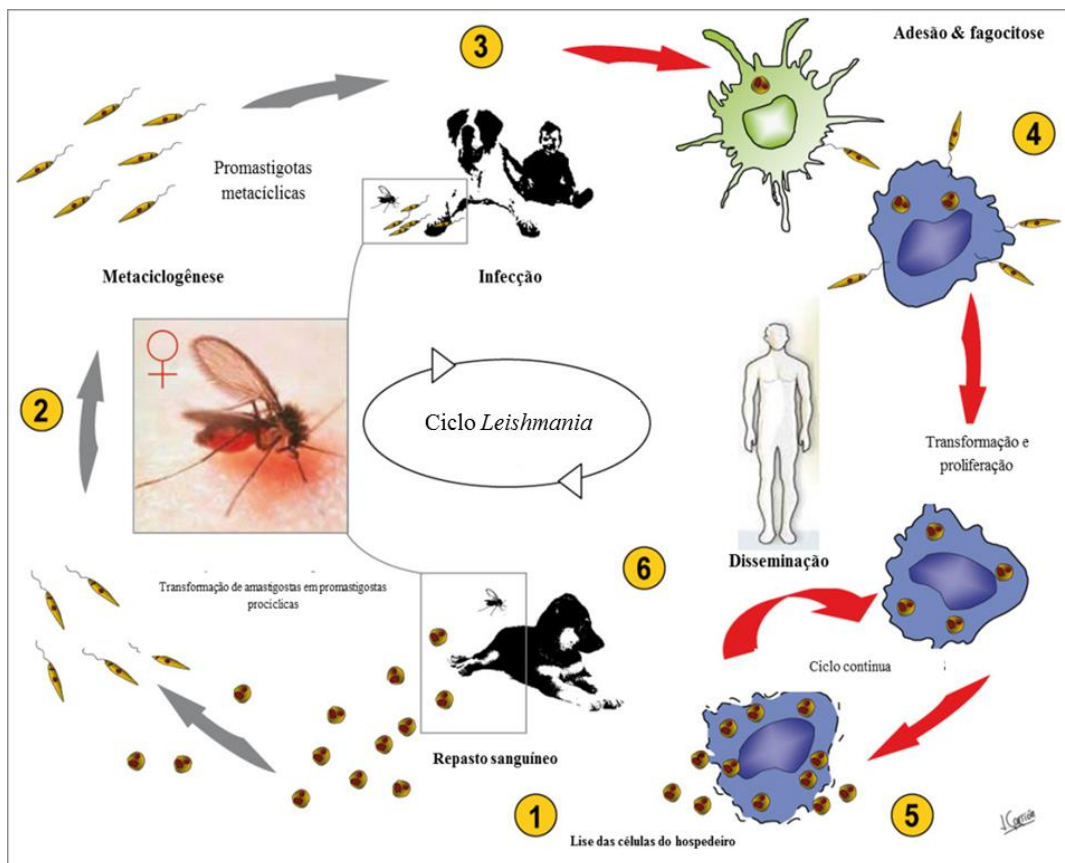


Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania infantum* com um exemplo geral do ciclo de *Leishmania*. Durante a hematofagia no hospedeiro infectado (1), flebotomíneos são infectados com amastigotas, que se transformam em promastigotas no intestino do mosquito (dependendo da espécie de *Leishmania*, diferentes regiões do intestino serão parasitadas) (2), em seguida os parasitos migram para a probóscide dos flebotomíneos. Ao realizar o repasto sanguíneo nos hospedeiros, flebotomíneos infectados regurgitam promastigotas de *Leishmania* na pele (3), que invadem ou são fagocitadas por células do hospedeiro, principalmente macrófagos (4). Dentro dos fagossomos de macrófagos, promastigotas se transformam em amastigotas (5), essas amastigotas replicam e infectam outros macrófagos, localmente, e disseminam para outros tecidos (6).

1.2 Aspectos da resposta imune

O processo de controle da infecção no hospedeiro vertebrado envolve a imunidade inata e adaptativa. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa formada por células *natural killers*, células dendríticas, neutrófilos e macrófagos, sendo as duas últimas as principais células presentes no momento inicial da infecção (Janeway & Medzhitov 2002).

Os neutrófilos são células muito importantes na infecção *Leishmania*-hospedeiro, uma vez que são as primeiras células de defesa recrutadas no sítio da infecção e, através da ação de enzimas digestivas tentam eliminar o parasito. Em contrapartida, essas células apresentam meia vida curta, sendo assim, quando infectadas, entram em apoptose e são fagocitadas por macrófagos (Awashti, 2004). Na infecção por *Leishmania*, os neutrófilos apoptóticos contendo parasitos vivos servem como “vetores”, e uma vez fagocitados pelos macrófagos, podem favorecer a proliferação do parasito (Ribeiro-Gomes & Sacks, 2012).

A principal função do macrófago é fagocitar os microorganismos presentes no microambiente e eliminar patógenos, com o auxílio de enzimas lisossomais e metabólitos tóxicos, como óxido nítrico, ou por meio da produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-12 (Naderer & McConville, 2008). O parasito *Leishmania* possui mecanismos de evasão da resposta imune inata, o que favorece sua internalização e sobrevivência dentro dessa célula (Lopes et al., 2014). Além disso, após a fagocitose do parasito, os macrófagos podem atuar como células apresentadoras de antígenos (APC's) e expor os peptídeos antigênicos para os linfócitos T através da expressão da molécula MHC (Kanakoudi-Tsakalidou et al., 2001).

Quando a imunidade inata não consegue controlar a infecção e a proliferação do parasito, se faz necessária uma resposta mais específica formada pela imunidade adaptativa. Assim, as respostas imunológicas inata e adaptativa coexistem.

Após a fagocitose dos parasitos pelas APC's, os antígenos são processados e apresentados via MHC (complexo de histocompatibilidade principal) aos receptores de células T presentes na superfície de linfócitos. Após o reconhecimento do antígeno, as células T tornam-se ativadas e ocorrem modificações que favorecem a proliferação e

diferenciação em células efetoras produtoras de citocinas e moléculas citotóxicas (Abbas & Janeway, 2000; Janeway & Medzhitov, 2002).

Para que os linfócitos T se tornem ativos, é necessário, além da apresentação do antígeno, um segundo sinal, que é desencadeado pela ligação de moléculas conhecidas como coestimulatórias mediada, principalmente, por moléculas da família B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) expressas na superfície celular das APC's. Essas moléculas tem como correceptor o CD28, que está presente na superfície da célula T. A interação do B7 com CD28 emite sinais intracelulares nas células T que estimulam a expressão de fatores de crescimento e citocinas como IL-2, promovendo, dessa maneira, a ativação dos linfócitos T (Elloso & Scott, 1999). Existe ainda um segundo receptor para B7, a molécula CTLA-4, a qual não é constitutivamente expressa nas células T. A interação B7/CTLA-4 inibe a ativação de células T através da redução da expressão de IL-2 e do seu receptor. Assim, o balanço entre expressão de CD28 e CTLA-4 é necessário para o controle das respostas das células T (McCoy & Le Gros, 1999). A ativação de linfócitos T proporciona modificações bioquímicas e, conseqüentemente, fenotípicas que envolvem, por exemplo, a indução da expressão do marcador de superfície CD69 em linfócitos recentemente ativados (Marzio et al., 1999).

Posteriormente, linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ ativados tornam-se efetores. Linfócitos T $CD4^+$ são importantes na resposta imune adaptativa, pois reconhecem os antígenos provenientes de digestão lisossomal que são apresentados a seus receptores de células T (TCR) via moléculas de MHC de classe II. Ao passo que, linfócitos T $CD8^+$ reconhecem antígenos derivados de digestão proteossômica que são apresentados a seu TCR via moléculas de MHC classe I (Haring et al. 2006; Mc et al. 2009).

Os linfócitos T $CD4^+$ podem ser divididos, principalmente, em duas subpopulações, conforme as citocinas presentes no microambiente que são essenciais nessa diferenciação: linfócitos T do tipo 1 (Th1) e do tipo (Th2). A presença das citocinas IL-12 e IFN- γ possibilita o desenvolvimento de uma resposta mais inflamatória, tipo Th1, enquanto a presença de IL-4 leva à diferenciação para uma resposta mais anti-inflamatória, tipo Th2 (Rogers et al. 2002; Janeway & Medzhitov 2002; Abbas & Janeway, 2000). Tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, observa-se a existência de um microambiente formado por várias citocinas consideradas pró e anti-inflamatórias. A citocina pró-inflamatória TNF- α está envolvida na ativação

endotelial e febre. Essa citocina é produzida por células NK, linfócitos T e macrófagos ativados, dentre outras células (Bradley, 2008). A citocina pró-inflamatória IFN- γ é produzida majoritariamente por linfócitos T e células NK, e está principalmente envolvida na ativação de macrófagos, estimulando a produção de citocinas, a explosão respiratória e produção de óxido nítrico (Schroder et al., 2004). Essas duas citocinas agem sinergisticamente e estimulam a expressão de moléculas pelo MHC em monócitos e macrófagos, potencializando a apresentação antigênica (Schroder et al. 2004). A principal citocina anti-inflamatória é a IL-10 que é produzida por monócitos, células T, macrófagos e células dendríticas. Uma das principais ações da IL-10 é controlar a ativação de macrófagos e, assim, evitar a exacerbação da resposta inflamatória. Além disso, esta citocina modula a resposta imune, inibindo a expressão de IL-12 e TNF- α , e exercendo, dessa maneira, um papel importante no controle da resposta inflamatória (Couper et al., 2008)

O recrutamento de linfócitos T CD8⁺ proporciona imunidade por diferentes mecanismos como a citólise de células infectadas, causada pela liberação de grânulos citoplasmáticos que contêm granzimas, uma família de serino-proteases capazes de induzir apoptose na célula-alvo (Mc et al. 2009; Lieberman, 2003). Desse modo, com o auxílio da proteína perforina formadora de poros, as granzimas são interiorizadas pelas células alvo e clivam substratos que iniciam a destruição do DNA e, conseqüentemente, levam à morte celular. As granzimas A e B são as mais comumente encontradas. A granzima A está relacionada com alguns fatores de apoptose, como condensação de cromatina e fragmentação nuclear (Lieberman 2003). Os linfócitos CD8⁺ também tem sua ação efetora pela produção de citocinas pro-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) ativadoras de macrófagos que, conseqüentemente, produzem metabólitos tóxicos importantes na eliminação do parasito (Mc et al. 2009; Gautam et al., 2014).

1.3 Manifestações clínicas e aspectos gerais da resposta imune das leishmanioses

As manifestações clínicas da leishmaniose variam desde lesões ulceradas na pele até a forma visceral. As duas formas clínicas clássicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA) são: Leishmaniose cutânea (LC) e Leishmaniose mucosa (LM). Outra forma clínica, não menos importante, mas pouco comum, é a Leishmaniose disseminada (LD) (de Oliveira-Neto et al., 2000). Essas três formas de leishmaniose, apresentam aspectos clínicos bem diferentes. Indivíduos com LC normalmente apresentam uma ou poucas úlceras de pele. Na LD, múltiplas lesões de pele, ulceradas ou não, são frequentemente encontradas disseminadas pelo corpo do paciente. LM é a forma mais grave da LTA, afetando principalmente a região mucosa do nariz e boca, podendo acarretar lesões desfigurantes no indivíduo (Vieira-Gonçalves et al., 2008). O desenvolvimento das formas clínicas da doença depende de alguns fatores como espécies do parasito, vetor, características epidemiológicas, constituição genética e condições imunológicas do hospedeiro (Rogers et al. 2002; Goto & Lindoso 2010). O curso clínico da doença depende do resultado de uma complexa interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro.

No caso da LTA, uma resposta imune celular caracterizada, especialmente, por um perfil inflamatório com a expressão de citocinas como IFN- γ , IL-12 e TNF- α , é importante no início da doença, pois estas citocinas levam à ativação de macrófagos e conseqüentemente ao controle do parasito (Castellano et al. 2009). Entretanto, o aumento na expressão de IFN- γ tem sido associado com o aumento da lesão, indicando que uma forte resposta inflamatória pode causar uma destruição celular e tecidual (Antonelli et al. 2005). Dentro deste pensamento, sabe-se que os pacientes com LC e LM apresentam uma elevada expressão de IFN- γ e TNF- α (Ribeiro-de-Jesus et al. 1998), mas, em vez de controlar a infecção, desenvolvem úlceras cutâneas e mucosas. Assim, é fundamental que a resposta imune responsável pela ativação do macrófago e eliminação do parasito seja, mais tarde, controlada para evitar lesão tecidual. Embora a citocina moduladora IL-10 seja expressa em células no local da lesão em pacientes com LM e LC, na lesão mucosa há menor expressão do receptor de IL-10 que nas células da lesão cutânea (Faria et al. 2005). Isso explica, em parte, a gravidade das lesões mucosas. Na LC, já foi visto que, na infecção recente, pacientes apresentavam uma predominância de IL-4 e IL-10. Entretanto, este é um fenômeno transitório, pois

pacientes com lesão tardia apresentam predominância de resposta Th1, sugerindo que o desenvolvimento da doença depende de uma desregulação da resposta de célula T (Baratta-Masini et al. 2007). A LD é caracterizada por uma resposta imune celular com anergia/hiporresponsividade específica contra antígenos de *Leishmania*, permitindo, assim, um crescimento desordenado do parasito (Barral & Barral-netto 2009).

A forma mais grave da leishmaniose é a visceral (LV), causadora de milhares de mortes anualmente (Who 2010). Após a infecção pela *Leishmania infantum/chagasi*, esse parasito dissemina-se por vários órgãos como a medula óssea, os linfonodos, o baço e o fígado. A presença do parasito nos diferentes órgãos leva ao quadro clínico clássico da LV que consiste em febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso, diarreia, dor e distensão abdominal. Frequentemente, casos muito graves podem evoluir para morte do hospedeiro (Gontijo, 2004). A LV é marcada por uma diminuição da resposta imune celular ao antígeno de *Leishmania*, e a citocina anti-inflamatória IL-10 é a principal expressa pelas células dos infectados. A IL-10 parece ser a principal citocina responsável pela redução da resposta de proliferação linfocitária e pela diminuição da expressão de citocinas inflamatórias como IFN- γ (Bacellar & Carvalho 2005).

A seguir, apresentam-se considerações sobre aspectos da resposta imunológica nas leishmanioses humanas, com foco nos estudos relacionados a moléculas que serão avaliadas neste trabalho.

1.4 Mecanismos de interação macrófago/*Leishmania*

No processo de infecção *Leishmania*/macrófago muitos parasitos são mortos, principalmente, por um dos mecanismos importantes no controle de patógenos, o fator de complemento. No entanto, outros parasitos conseguem escapar da ação desse fator de complemento e resistem à lise. Acredita-se que durante o processo de interação *Leishmania*/macrófago, a expressão da molécula gp63, presente na superfície do parasito, converta o fator do complemento C3b para a sua forma inativa iC3b. Assim, com esse fator do complemento inativo, algumas moléculas presentes na membrana do parasito, por exemplo LPG, se ligam a receptores presentes na membrana das células do

hospedeiro, como o receptor do complemento C3b (CR3), que favorecem a adesão da *Leishmania* e promovem sua internalização (Mosser & Handman 1992).

Apesar dos inúmeros mecanismos de evasão que os parasitos utilizam, as células do sistema imune inato possuem receptores, como os do tipo Toll (TLR), que reconhecem padrões moleculares do parasito. Desse modo, torna-se apto a ativar vários fatores de transcrição, desencadeando a produção de citocinas e quimiocinas, que culminam na formação da resposta inflamatória (Tuon et al. 2008).

Os receptores do tipo Toll são proteínas transmembrana que conferem especificidade às células da imunidade inata. A família TLR é composta por 12 membros, os quais têm especificidades para diferentes patógenos e induzem a produção de diferentes citocinas. Os receptores TLR podem ser encontrados na membrana plasmática ou na membrana interna de endossomos de células como macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* e neutrófilos. A via de sinalização de TLR é um dos primeiros sistemas de defesa contra microorganismos invasores (Kumar et al. 2009; Kawai & Akira 2010).

Os TLR são capazes de reconhecer antígenos específicos de patógenos, conhecidos pela nomenclatura de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os PAMPs são, em geral, moléculas de superfície ou estruturas internas, tais quais o RNA, DNA, proteínas e enzimas que são produzidas por vírus, bactérias, fungos e parasitos e não por células do hospedeiro; o que confere ao sistema imune a habilidade de diferenciar entre o que é próprio e não próprio (Tuon et al. 2008). A estimulação de TLR por ligantes induz uma variedade de fenômenos e funções celulares como maturação, fagocitose e atividade microbicida e produção de citocinas inflamatórias tais como TNF- α , IFN- γ e IL-12 (Srivastava et al. 2012).

Alguns trabalhos mostraram recentemente que diferentes receptores TLR participam do reconhecimento de *Leishmania*, sendo a maioria relacionada à ativação de TLR2 e TLR9 (Tuon et al. 2008; Vieira et al. 2013). Dependendo da espécie de *Leishmania* em questão, a ativação de TLR pode desencadear o estabelecimento ou inibição da doença (Srivastava et al. 2013).

Nosso grupo de pesquisa estudou a expressão da molécula TLR9 por monócitos de indivíduos com leishmaniose cutânea. Foi possível observar que, quando esses

monócitos foram estimulados com antígenos solúveis de *L. braziliensis*, houve uma maior expressão de TLR9 em relação à cultura não estimulada. Observou-se, também, uma correlação positiva entre a expressão de TLR9 e a área da lesão, sugerindo que a molécula esteja envolvida na imunoregulação da resposta contra *Leishmania* (Vieira et al. 2013).

Alguns trabalhos têm associado a sobrevivência e a virulência na célula hospedeira à presença de moléculas de superfície nas diferentes espécies de *Leishmania*. A forma promastigota de *Leishmania* possui, em sua superfície, o glicocálice, composto, em sua maioria, por moléculas que são fixadas com a âncora de glicosilfosfatidinositol (GPI). Estas moléculas ancoradas por GPI incluem a proteína glicoproteína (gp63) e uma das moléculas mais abundantes na superfície do parasito, o lipofosfoglicano (LPG). As moléculas LPG e gp63 são as principais responsáveis pela virulência do parasito (Späth et al. 2003; Joshi et al. 2002). Têm-se estabelecida que a função de LPG esteja relacionada à infecção em macrófagos e à sobrevivência no inseto vetor. Por outro lado, gp63 também auxilia a infecção do parasito nas células do hospedeiro e na manutenção da sobrevivência da forma amastigota no vacúolo parasitóforo (Späth et al. 2003; Joshi et al. 2002).

Trabalhos na literatura apontam para a existência de polimorfismo na estrutura de LPG intra e interespecies de *Leishmania* (De Assis et al. 2012; Ibraim et al. 2013). Polimorfismos dos glicoconjugados sejam eles LPG, GIPLs e gp63, são importantes na regulação diferencial dos eventos iniciais da resposta imune, bem como no estabelecimento da infecção. A variação na estrutura do LPG resulta em uma ativação diferencial de macrófagos, tendo como consequência a produção distinta de citocinas e/ou níveis de óxido nítrico (Ibraim et al. 2013). Estudos moleculares mostram a existência de polimorfismos genéticos em moléculas de superfície entre cepas de *L. braziliensis* (Schriefer et al. 2004). A presença de diversidade genética entre cepas permite uma capacidade distinta de infectar os macrófagos e, assim, as moléculas de superfície do parasito podem modular a interação entre *Leishmania* e as células do hospedeiro, influenciando no curso clínico da doença (Farias et al. 2013) e no aparecimento de diferentes imunopatologias na leishmaniose (Ibraim et al. 2013). A variação da virulência entre cepas diversas de *Leishmania* pode levar à manifestação tecidual (Pereira et al. 2009) e a uma resposta inflamatória diferenciada (Teixeira et al. 2005). Como mencionado, discrepâncias na estrutura e composição dessas moléculas

podem influenciar a resposta imune inata e o estabelecimento diferencial da infecção, gerando variadas manifestações clínicas, tais como LV e LT (De Assis et al. 2012).

Estudos que avaliam os fatores de virulência em *L. chagasi* mostram-se essenciais para um melhor entendimento da relação entre o parasito e as células do hospedeiro que podem levar à patogênese. Através do uso de modelo experimental com hamsters, e também de experimentos realizados *in vitro*, Fonseca-Pires et al. caracterizam a virulência de duas cepas de *L. chagasi* (*Lc* BH46 e *Lc* BH400), avaliando os níveis de expressão de proteínas que podem determinar a virulência e a patogenicidade de cepas de *Leishmania*. Foi observado, *in vitro*, que a cepa *Leishmania chagasi* (*Lc*) BH46 tem menor infecciosidade quando comparada à cepa *Lc* BH400 (Da Fonseca Pires et al. 2014). No entanto, em modelo *in vivo*, percebeu-se ainda que a cepa *Lc* BH46 induz manifestações clínicas mais brandas, com menor aumento do baço em hamsters infectados, quando comparados com a infecção pela cepa *Lc* BH400. Além disso, também foi encontrada diferença na expressão de algumas proteínas de superfície em ambas as cepas, caracterizando-as como menos virulentas (*Lc* BH46) e mais virulentas (*Lc* BH400) (Da Fonseca Pires et al. 2014). Moreira e colaboradores avaliaram a mortalidade e o parasitismo da cepa PP75 (cepa de referência OMS) e de uma cepa selvagem, ambas pertencentes à *L. Chagasi*. Foi observado intenso parasitismo e alta mortalidade em hamsters infectados com a cepa selvagem (Moreira et al. 2012). Braga, 2011 inferiu que essas cepas selvagens são pertencentes à espécie *L. chagasi* e que há uma diferença molecular entre os isolados e a cepa de referência *L. chagasi* (Braga 2011).

Dessa forma, avaliar a característica da resposta imune em monócitos infectados com as diferentes cepas causadoras de LV e LTA nos ajuda a elucidar quais os principais mecanismos do sistema imune após a infecção, e como eles podem estar envolvidos no estabelecimento das diferentes formas clínicas da leishmaniose.

Nossa hipótese foi de que a infecção de monócitos humanos por diferentes cepas de Leishmania leva a uma ativação diferencial e uma distinta expressão de moléculas associadas à resposta imunológica na doença.

1.5 Aspectos gerais dos linfócitos T na leishmaniose

Tem sido demonstrada por diversos grupos que linfócitos T têm grande importância na resposta contra a leishmaniose (Gollob et al. 2005; Dutra et al. 2011; Faria et al. 2005; Cardoso et al. 2015; da Silva Santos & Brodskyn 2014). Embora a maior parte dos trabalhos na literatura esteja relacionada com o papel de linfócitos T CD4⁺ produtoras, principalmente, de IFN- γ (Antonelli et al. 2005), a presença de linfócitos T CD8⁺ na resposta imune contra a leishmaniose também é relatada. Estudos sugerem que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ desempenham funções distintas na resposta contra a leishmaniose (Cardoso et al. 2015; da Silva Santos & Brodskyn 2014) e são importantes fontes produtoras de citocinas que estão envolvidas na ativação do macrófago (Da-cruz et al. 2002).

A análise das características funcionais dos linfócitos T reativos de pacientes infectados por *L. braziliensis* na fase ativa da doença, mostrou predomínio de linfócitos T CD4⁺ e polarização para resposta Th1, produzindo, majoritariamente, IFN- γ (Da-Cruz 2002). A população de linfócitos T CD4⁺ efetoras é importante na proteção efetiva contra a infecção por *Leishmania* (Carvalho et al. 2013; Da-cruz et al. 2002). No entanto, é necessária a geração e manutenção de uma resposta imune em longo prazo, gerada pelos linfócitos T CD4⁺ de memória (Gollob et al. 2005). A manutenção de uma resposta imune antígeno-específica é importante para a resistência à reinfecção e para o desenvolvimento de vacinas (Scott et al. 2004). Carvalho et al., avaliaram a resposta imune em pacientes tratados e curados de leishmaniose cutânea e observaram que os linfócitos T CD4⁺ de memória efetora desses indivíduos tiveram uma baixa produção de IFN- γ em resposta ao antígeno de *Leishmania*. Assim, a maioria dos indivíduos curados perdeu a capacidade de responder, *in vitro*, ao estímulo do parasito 15 anos depois do tratamento (Carvalho et al. 2013). Dessa forma, faz-se necessário entender a participação das células de memória em pacientes com leishmaniose cutânea ativa.

As células de pacientes com LC infectados com *L. braziliensis* produzem grande quantidade de granzima e têm maior citotoxicidade quando comparadas às de pacientes subclínicos (Cardoso et al. 2015). Faria et al., demonstraram que o recrutamento de linfócitos T CD8⁺, que expressa granzima A em lesão de pacientes com LC, está correlacionada positivamente com a progressão da lesão nesses pacientes (Faria et al.

2010). Em pacientes com LM não tratados, também observa-se maior citotoxicidade de linfócitos T CD8⁺ no contraste com pacientes com LC, o que pode justificar o dano tecidual e a gravidade da forma mucosa (Brodskyn et al. 1997). Desse modo, esses achados suportam a hipótese de que tais células potencialmente citotóxicas desempenham um importante papel na patogênese da leishmaniose cutânea (Cardoso et al. 2015; Faria et al. 2010). De maneira contrária, pacientes com LV infectados com *L. donovani* apresentam diminuída proliferação de linfócitos T CD8⁺ e redução de citocinas inflamatórias, que podem estar correlacionadas com a sua susceptibilidade à doença. Entretanto, nos indivíduos curados, têm-se observado uma rápida e importante proliferação de linfócitos com produção de granzima, o que pode contribuir para a resistência à doença (Kaushal et al. 2014). Além disso, constatou-se em pacientes LV crônicos um estado de exaustão/anergia nos linfócitos T CD8⁺, que consequentemente, apresenta uma limitada capacidade de produção de IFN- γ (Gautam et al. 2014).

Como exposto, linfócitos T CD8⁺ participam tanto na proteção como na patogênese das leishmanioses. Dessa forma, torna-se importante a compreensão da resposta dessas células frente à infecção por diferentes espécies de *Leishmania*.

1.6 Transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs)

A resposta imune celular direcionada contra *Leishmania* é fundamental no controle da replicação do parasito e na resolução da doença. Entretanto, uma resposta ineficaz pode provocar o estabelecimento da patologia (Gollob et al. 2014). Tem sido visto que a participação de uma resposta imune adaptativa, representada pelos linfócitos T, é muito importante na resistência contra a doença (Carvalho, 2007). Sabe-se que o crescimento, desenvolvimento e diferenciação desses linfócitos são orquestrados pelas citocinas que se encontram presentes no microambiente e, também, da cascata de sinalização estabelecida pelo recrutamento das STATs (do inglês: signal transducers and activator of transcription) (Yagi et al. 2011).

As STATs são uma família de proteínas chamadas transdutores de sinal e ativadores de transcrição, que são fatores de transcrição citoplasmáticos latentes, podendo ser ativados para regular expressão gênica em resposta a um grande número de

peptídeos de sinalização celular, incluindo citocinas. Esses genes controlam o desenvolvimento e manutenção de linfócitos (Imada & Leonard 2000). Existem receptores de citocinas presentes na superfície das células imunes e outras células do organismo. Com a ligação das citocinas em seus receptores, ocorre a ativação da proteína associada ao receptor chamado Janus-kinase (JAK). Uma vez que JAK encontra-se ativada, ela recruta e fosforila os fatores de transcrição STATs que se encontram inativos no citoplasma. Posteriormente, ocorre a dimerização das STATs que são translocadas para o núcleo, onde elas se ligam à região promotora de determinado gene favorecendo a sua transcrição (Murray 2006).

Algumas STATs são ativadas em resposta a citocinas inflamatórias e/ou resposta do tipo Th1, como as STAT-1, STAT-4, STAT-5, NFkB. Outras são ativadas por citocinas anti-inflamatórias associadas com a resposta Th2, como STAT-3 e STAT-6 (Maier, 2012, Stam, 1999, Yagi, 2011). O desenvolvimento e a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ em uma resposta Th1 e Th2 depende das citocinas presentes no ambiente e, conseqüentemente, das STATs relacionadas a este processo de diferenciação. A presença da IL-12 no microambiente ativa a via de STAT-4, na qual o fator de transcrição se liga à região promotora do gene e induz à produção de citocinas de resposta inflamatória (Kaplan et al. 1998). Entretanto, uma resposta anti-inflamatória é promovida pela IL-4 e pelo fator de transcrição STAT-6 (Maier et al. 2012).

Alguns trabalhos mostram, em modelos experimentais, a importância das STATs na leishmaniose. Stamm, et al., 1999 observaram que camundongos C57BL/6, conhecidos por serem resistente a infecção pela *L. major*, quando deficientes em STAT-4, se infectados com *L. major* produzem níveis mais baixos de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺. Este achado indica que a STAT-4 é necessária para uma resposta Th1 eficiente (Stamm, 1999). Têm-se demonstrado, também, com camundongos C57BL/6 infectados por *L. major*, que a deficiência da proteína STAT-1, cuja ativação é dependente da presença de IFN- γ , induz um intenso processo inflamatório e grave lesão tecidual, possivelmente devido à inibição da ativação de macrófagos e à deficiência na eliminação do parasito (Barbi, 2006).

A presença e importância das STATs não se limitam à leishmaniose, mas percebe-se a sua ação em outras doenças. Por exemplo, na doença de Chagas, em que o controle da infecção de *Trypanosoma cruzi* está relacionado a uma resposta marcada

pela ativação de IFN- γ . Sabe-se que camundongos deficientes em STAT-1, e infectados por *T. cruzi*, apresentam maior infecção e carga parasitária quando comparados com camundongos selvagens (Kulkarni et al. 2015). Outro exemplo da importância das STATs se refere a seu papel em neoplasias. Drogas são utilizadas para promover a inibição da via de sinalização de STAT em pacientes com neoplasias mieloproliferativas. Foi visto que pacientes que recebiam uma droga específica, modulavam a fosforilação de STAT5 dependente de IL-2, regulando, dessa forma, a proliferação de linfócitos T CD4⁺ (Parampalli, 2015). Assim, pode-se observar a importância de conhecer as principais STATs envolvidas na resposta imune em diferentes doenças.

Os mecanismos envolvidos nas vias de sinalização intracelular ativadas em resposta às citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias na leishmaniose são pouco estudados. Dessa forma, o nosso estudo se justifica na uma vez que há uma escassez de trabalhos na literatura que abordam a participação das STATs em pacientes com leishmaniose.

Nossa hipótese é que, com a presença da infecção nos indivíduos com leishmaniose tegumentar, há uma regulação na cascata de sinalização intracelular, de forma que serão predominantes as fosfo-STATs relacionadas com um perfil de resposta inflamatória mais exacerbada e diminuição de um perfil regulatório.

2. OBJETIVOS

Com base nas hipóteses que (1) a infecção de monócitos humanos por diferentes cepas de *Leishmania* leva a uma ativação diferencial e uma distinta expressão de moléculas associadas à resposta imunológica na doença e que (2) com a presença da infecção nos indivíduos com leishmaniose tegumentar, há uma regulação na cascata de sinalização intracelular, de forma que serão prevalecidas as fosfo-STATs relacionadas com um perfil de uma resposta inflamatória, elaboramos os seguintes objetivos:

2.1 Objetivo geral

Caracterizar e avaliar a resposta imune de monócitos humanos após a infecção *in vitro* com diferentes cepas de *Leishmania* e analisar, em linfócitos de indivíduos portadores de leishmaniose tegumentar, os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs).

2.2 Objetivos específicos

Os nossos objetivos foram divididos em duas partes. A 1ª parte foi desenvolvida para avaliar a ativação de monócitos infectados com diferentes cepas de *Leishmania*. A 2ª parte foi desenvolvida para determinar as vias de sinalização intracelular ativadas (via medida de fosfo-STATs) em resposta às citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em linfócitos provenientes de sangue periférico de indivíduos portadores de leishmaniose tegumentar.

2.2.1 Objetivos específicos 1ª parte:

- Determinar e comparar as fases de crescimentos das cepas (MHOM/BR/1975/M2904) *Leishmania braziliensis*; (MHOM/BR/1972/BH46) e, principalmente, da cepa selvagem *Leishmania chagasi* através de uma curva de crescimento dos parasitos.
- Avaliar a expressão de moléculas de ativação (CD14, CD80, CD86, HLA-DR), bem como dos receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR9) e da expressão das citocinas (TNF- α ,

IL-12/IL-23p40 e IL-10) nas subpopulações de monócitos CD14⁻ e CD14⁺ infectados com diferentes cepas de *Leishmania*.

- Analisar o controle de infecção em monócitos infectados com diferentes cepas *Leishmania* através de diluição limitante.
- Avaliar a correlação entre a expressão de TLR, moléculas co-estimuladores e a expressão de citocinas em monócitos infectados com diferentes cepas de *Leishmania*.
- Avaliar, em linfócitos T CD8⁺, a expressão das moléculas de ativação (CD69) e inibição (CTLA-4), além, da produção intracelular de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-10) e da molécula citotóxica Granzima A.

2.2.2 Objetivos específicos 2ª parte:

- Avaliar a expressão dos fatores de transcrição intracelular ativados (pSTAT-1, pSTAT-3, pSTAT-4, pSTAT-5, pSTAT-6 e pNFkB) em linfócitos totais em indivíduos portadores de leishmaniose tegumentar.
- Determinar a frequência da população de linfócitos de memória/efetoras (CD45RA⁻) e células virgens (CD45RA⁺) expressando as diferentes pSTATs.
- Correlacionar na subpopulação de linfócitos a expressão de pSTATs e a área de reação ao teste de Montenegro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Metodologia referente à 1ª parte dos objetivos

3.1.1 Parasitos e cultura de *Leishmania*

Os parasitos *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cepa: MHOM/BR/1975/M2904 e *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*, cepa: MHOM/BR/1972/BH46 utilizados neste trabalho são cepas de Referência da Organização Mundial da Saúde e pertencem às espécies de maior importância médica no Brasil. A cepa selvagem (*Lc* cepa selvagem) de *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi* foi gentilmente cedida pelo professor Rodolfo Cordeiro Giunchetti (Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia, ICB, UFMG). Esta cepa selvagem foi isolada de cão naturalmente infectado na cidade de Governador Valadares-MG. As formas promastigotas de *L. braziliensis* (*Lb* 2904) e de *L. infantum/chagasi* (*Lc* BH46) foram obtidas a partir do banco de criopreservação de *Leishmania* em nosso laboratório. As espécies foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich) pH 7,2 contendo 10% de soro fetal bovino e 1% antibiótico. Os parasitos foram cultivados em garrafas plásticas de 10 mL, em estufa demanda bioquímica de oxigênio (BOD), a $\pm 23^{\circ}\text{C}$ com repiques a cada 3 dias até se obter um número de parasitos suficientes para a infecção *in vitro*.

3.1.2 Curva de crescimento dos parasitos

Os parasitos foram cultivados em meio Schneider completo a $\pm 23^{\circ}\text{C}$ em garrafa de cultura com um inóculo inicial de 1×10^6 parasitos/mL. Para fazer as curvas de crescimento *in vitro*, foi avaliado por contagem diária em hematocítmetro, o número de parasitos durante 10 dias de cultivo. Para cada cepa de *Leishmania* foi determinada a fase logarítmica e a fase estacionária de crescimento. Essas duas fases se diferenciam por grande parte da cultura do parasito estar nas formas procíclicas e metacíclicas (infectantes) dos parasitos, respectivamente. Uma curva gráfica foi realizada para visualização das diferentes fases de crescimento das diferentes cepas do parasito, principalmente, para se conhecer o crescimento da cepa *Lb* selvagem.

3.1.3 Doadores

Os participantes desse estudo foram indivíduos voluntários de Belo Horizonte, MG, não infectados com *Leishmania*, com média de idade 29,4 anos, variando entre 21 e 45 anos. O número total de indivíduos foi de 10 doadores, sendo 5 do gênero masculino e 5 do gênero feminino. Este estudo obteve aprovação nacional da CONEP # CAAE 01229212.0.0000.0049.

3.1.4 Purificação de células mononucleares do sangue periférico

O sangue periférico dos doadores foram coletados em tubos a vácuo contendo heparina sódica. Foram acrescidos ao sangue solução tampão PBS 1x (Sigma Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA) no mesmo volume que o do sangue a ser analisado. O sangue acrescido de PBS foi vertido lentamente sob o Ficoll-Paque (GE Healthcare, Piscataway, USA) contido em tubos plásticos. O volume de Ficoll-Paque utilizado foi o mesmo que o do sangue original. Os tubos com o gradiente de Ficoll foram centrifugados a 200 g, por 40 minutos à temperatura ambiente.

Após o período de centrifugação, foi coletado o anel de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) presente na interface entre o plasma e o Ficoll-Paque, sendo coletado com o auxílio de uma pipeta e transferido para outro tubo, onde ocorreram lavagens com PBS 1x para remoção de resíduos de Ficoll-Paque. Essas amostras foram lavadas e centrifugadas (200 g, por 10 minutos a 4°C) por duas vezes. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspensionado em meio RPMI suplementado com antibiótico (penicilina 200U/mL e estreptomicina 0.1mg/mL), 1mM L-glutamina e 10% de soro humano inativado. A viabilidade celular foi avaliada pelo corante azul de Tripán (diluição das células em corante 1:20 v/v), seguida de contagem em hematocítômetro.

3.1.5 Infecção das CMSP com diferentes cepas de *Leishmania*

As diferentes cepas foram marcadas com o corante 5-(e-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDASE), que será referido ao longo do texto de CFSE. Esse composto é permeável à membrana e quando ele penetra na célula, é hidrolisado

por esterases endógenas, passando a emitir fluorescência. Após a clivagem, o CFSE se associa a proteínas do citoesqueleto ficando impossibilitado de sair da célula. Para realizar a marcação com CFSE, *Leishmania* spp. foram ressuspensas para a concentração de 6×10^7 parasitos/mL, e o marcador CFSE (Molecular Probes) foi adicionado ao tubo na concentração final de $5 \mu\text{M}$. As promastigotas de *Leishmania* foram incubadas em estufa de CO_2 a 37°C por 15 minutos. Em seguida, os parasitos foram lavados com PBS gelado acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA), centrifugando 500 g a 4°C . Os parasitos foram lidos no citômetro de fluxo para determinar a intensidade e eficiência da marcação.

A proporção de 10 parasitos marcados com CFSE por célula foi usada para infecção *in vitro* de CMSP de indivíduos saudáveis. As culturas de CMSP e parasitos e somente CMSP, foram realizadas em tubo fosco com meio RPMI completo, sendo mantida em estufa úmida a 5% de CO_2 a 37°C . Após 4 horas de cultura, as células foram lidas no citômetro de fluxo para determinar a intensidade de infecção inicial através da porcentagem de monócitos positivos para CFSE. Decorrido o tempo de 12 horas de cultura, foi adicionada brefeldina-A ($1 \mu\text{l/mL}$) aos tubos que foram novamente incubados por mais 4 horas, totalizando 16 horas de cultura. Após a infecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas a 200 g, 10 minutos a 4°C . Ao fim das lavagens, as células foram ressuspensas em PBS e transferidas para a placa de 96 poços contendo 2×10^5 de CMSP em cada poço.

3.1.6 Marcação das moléculas de superfície e intracelular em monócitos provenientes de CMSP infectadas *in vitro* por diferentes cepas de *Leishmania*

Após a infecção e cultura, as células foram incubadas na presença de anticorpos monoclonais de superfície por 15 minutos a 4°C . As amostras, após marcação, foram lavadas com PBS e fixadas com $200 \mu\text{L}$ de PBS com 2% formaldeído (Sigma Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a marcação com anticorpo para moléculas de superfície em monócitos (CD14, CD80, CD86, HLA-DR e TLR2) e linfócitos (CD8, CTLA-4) e a fixação, as células foram permeabilizadas com solução tampão de saponina 0,5% em PBS durante 15 minutos a 4°C . Em seguida, foram centrifugadas, e incubadas com os anticorpos para marcação de

moléculas intracelulares em monócitos (TNF- α , IL-12/IL-23p40, IL-10 e TLR9) e linfócitos (CD69, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-10 e granzima A) diluídos na mesma solução de permeabilização por 30 minutos a 4°C. Todos os anticorpos utilizados estão representados no Quadro 1. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes por centrifugação com o mesmo tampão, fixadas e adquiridas utilizando-se o citômetro de fluxo (BD FACSCanto II – Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA).

Para a leitura no citômetro de fluxo, foi adquirida uma média de 30.000 eventos na região de linfócitos para cada amostra. A aquisição e o armazenamento dos dados foram obtidos pelo software BD FACSDiva 6.0.

Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Lote	Clone	Volume utilizado
CD14	BV421	Biologend	B175722	M5E2	0,5 μ l/well
CD80	PECY7	Biologend	B132813	2D10	2 μ l/well
CD86	PECY5	eBioscience	E033803	IT2.2	2 μ l/well
TLR9	PE	eBioscience	E026719	eB721665	3 μ l/well
TLR2	PE	eBioscience	E016433	TL2.1	4 μ l/well
HLA-DR	PECY7	Biologend	B147634	L243	1 μ l/well
CD8	PECY5.5	Biologend	B148631	RPA-T8	0,5 μ l/well
CTLA-4	PE	Biologend	B172701	eBio20A	2 μ l/well
CD28	BV510	Biologend	B167902	CD28.2	4 μ l/well
TNF- α	PERCPCY5.5	Biologend	171068	Bi	3 μ l/well
CD69	APC	Biologend	B163320	FN50	1 μ l/well
IL-10	PECY7	Biologend	B173504	JES3-9D7	2 μ l/well
IL-12/23p40	PE	eBioscience	E26304	eBioHP4	1,5 μ l/well
IFN- γ	BV510	Biologend	B170302	4SB3	3 μ l/well
IL-17	BV450	Biologend	E14962103	eBio64D	2 μ l/well
Granzima A	PE	BD Pharmingen	75238	CB9	3 μ L/well

Quadro 1. Lista de anticorpos utilizados nos experimentos.

3.1.7 Estratégia de análises de monócitos e linfócitos infectados *in vitro* com diferentes cepas de *Leishmania*

Após aquisição das amostras, os dados foram obtidos com auxílio do programa FlowJo 7.6.5. Para a avaliação do perfil celular da amostra, foi solicitado um gráfico de tamanho e granulosidade das CMSP, e selecionada a região R1 dos monócitos (Figura 2A). Posteriormente, dentro da população de monócitos foram selecionadas as sub-populações CFSE⁺CD14⁺ ou CFSE⁺CD14⁻ nas quais foi avaliada a expressão das diferentes moléculas. A expressão dos marcadores de interesse foi baseada nos histogramas obtidos dentro de cada sub-população para a condição meio não estimulada (controle) e as diferentes infecções com as diferentes cepas de *Leishmania*.

Para a análise das moléculas em linfócitos, foi solicitado um gráfico de tamanho *versus* granulosidade das CMSP, e selecionada a região R2 dos linfócitos (Figura 2E). Posteriormente, dentro da população de linfócitos T CD8⁺ foram analisados os marcadores de interesse nas culturas infectadas ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*.

3.1.8 Ensaio controle de infecção por diluição limitante

O ensaio de proliferação em nosso estudo teve o objetivo de avaliar a capacidade de proliferação de cada cepa de *Leishmania* após a infecção de CMSP. Foram realizados experimentos com 2×10^5 células, posteriormente infectadas com 2×10^6 *Leishmania* de cada uma das três cepas de estudo. Após a cultura por 16 horas, todo o volume foi lavado duas vezes com PBS gelado e centrifugado por 500 g, a 4°C, por 15 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado em 300µl de meio Schneider e adicionado ao primeiro poço de uma placa de 96 poços, os demais poços receberam 200µl de meio Schneider. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas 1:3 transferindo 100µl do primeiro poço para o poço seguinte que encontrava-se com 200µl de meio Schneider até o 24° poço na placa. A medida que foi realizada a diluição, cada poço seguinte recebeu uma quantidade menor de *Leishmania* que o poço anterior. Após as diluições seriadas, as placas foram mantidas em cultura por mais 5 dias à 23°C em estufa climatizada BOD. Cada poço foi observado após 5 dias utilizando um microscópio invertido para avaliar a última diluição positiva na qual puderam ser visualizadas *Leishmania*. Foi realizado o controle de cultura somente com *Leishmania*, e não foi

observada diferença estatística quando comparou-se o crescimento entre as três cepas. Para calcular a diferença do controle de infecção nas culturas infectadas com as diferentes cepas foi contado como 1 a última diluição positiva para a cultura com *L. braziliensis* (a diluição foi 1:2187) e calculado quantos vezes foi maior o controle de *Leishmania* para as outras cepas (baseado na diluição).

3.1.9 Análises estatísticas

Os resultados obtidos desse estudo foram submetidos ao teste de normalidade e quando assumiram distribuição paramétrica, aplicou-se a análise de variância ANOVA One-way, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados foram submetidos aos testes de outliers de Grubbs. Nas análises de correlação, foi empregado o teste de Pearson para os dados paramétricos. Os dados foram considerados significativos quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0®.

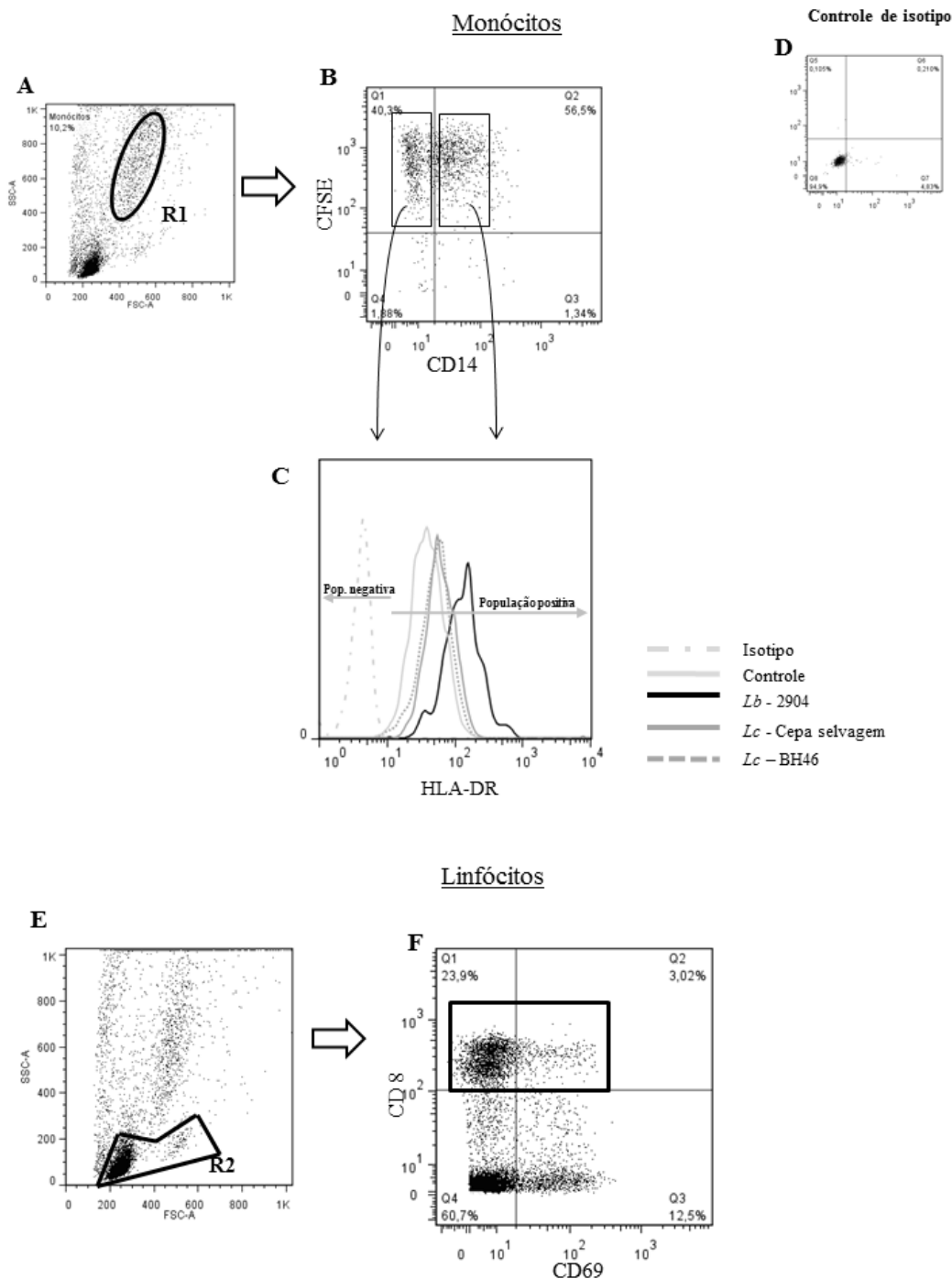


Figura 2: Gráfico de dispersão puntual (A, B e D, E, F) e histograma (C) representativos da estratégia de análise de monócitos e linfócitos. A) População de monócitos selecionados (Região R1) de acordo com os parâmetros morfológicos, tamanho e granulosidade (FSCxSSC). B) Após a primeira seleção, foram construídos gráficos com as marcações CFSE *versus* CD14, no qual, foram selecionadas as subpopulações CFSE⁺CD14⁻ ou CFSE⁺CD14⁺. C) Foram gerados gráficos de histogramas avaliando-se a expressão dos marcadores de interesse no estudo (exemplificado pelo HLA-DR), para cada condição. D) Controle de isotipo (para marcação inespecífica). E) População de linfócitos selecionados (Região R2) de acordo com os parâmetros morfológicos, tamanho e granulosidade (FSCxSSC). F) Gráficos foram gerados para análise dos marcadores de interesse dentro da população de linfócitos T CD8⁺ (exemplificado pelo CD69).

3.2 Metodologia referente à 2ª parte dos objetivos

3.2.1 Pacientes e controles

As amostras analisadas nesta parte do estudo foram de sangue obtido de 10 pacientes de Corte de Pedra, Bahia, área endêmica para leishmaniose, onde é prevalente a infecção com *L. braziliensis*. Clinicamente, todos os pacientes apresentavam lesões ulceradas entre 15 dias e 3 meses de duração (Tabela 1). O diagnóstico de leishmaniose foi baseado nos achados clínicos, exames parasitológicos e/ou teste de Montenegro positivo. O sangue total de cinco doadores saudáveis de Belo Horizonte, Minas Gerais, foram usados como controle no grupo não infectado. Todos os indivíduos participantes no estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e receberam tratamento participando ou não do estudo. Este estudo obteve aprovação nacional da CONEP # CAAE 01229212.0.0000.0049.

Tabela 1. Perfil clínico de pacientes com leishmaniose cutânea

Paciente	Gênero	Idade	Área total da lesão envolvida (mm ²) ^a	Teste de Montenegro (MST) (mm ²) ^b
P1	Masculino	14	440	324
P2	Feminino	29	182	910
P3	Masculino	29	120	270
P4	Masculino	42	ND ^c	442
P5	Masculino	43	ND ^c	255
P6	Masculino	16	255	255
P7	Masculino	18	ND ^c	420
P8	Masculino	21	0,2	72
P9	Feminino	50	160,25	225
P10	Masculino	14	392	240

NOTA: ^aÁrea de dois diâmetros para cada lesão ou MST. ^bÁrea de dois diâmetros para cada lesão ou MST. ^cNão determinado.

3.2.2 Preparo do antígeno

O antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) de *L. braziliensis* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de leishmanioses (ICB/UFMG/W. Mayrink). Brevemente, promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/81/HJ9) foram lavadas e ajustadas para 10^8 promastigotas/mL em PBS. Posteriormente, foram realizados repetidos ciclos de congelamento e descongelamento e uma ultrasonificação final. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi mensurada pelo método de Lowry.

3.2.3 Marcação de moléculas de superfície e STATs

Para determinar o perfil de linfócitos que expressavam as fosfo-STATs ativadas (pSTATs) foram realizadas marcações para moléculas de superfície e pSTATs com anticorpos monoclonais. Brevemente, 2×10^5 de células foram cultivadas *in vitro* por 3 horas com ou sem SLA (concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$) em 200 μl de meio RPMI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 5% de soro humano inativado (Sigma), antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL) e 1 mM L-glutamina. Para a marcação de superfície foi utilizado o marcador CD45RA, utilizando-se protocolo semelhante ao descrito acima. Em seguida, as células foram permeabilizadas com a solução de permeabilização III contendo metanol, para marcação de p-STATs citoplasmáticas e nuclear usando os anticorpos pSTAT-1, pSTAT-5, pSTAT-3, pNFkB, pSTAT-4 e p-STAT-6. A marcação com os anticorpos anti pSTAT foi realizada por incubação durante 30 minutos a temperatura ambiente, e posterior lavagem por centrifugação. Posteriormente, as amostras foram fixadas e lidas no citômetro de fluxo adquirindo-se 35.000 eventos na região de linfócitos para cada amostra. A aquisição e o armazenamento dos dados foram obtidos pelo software BD FACSDiva 6.0.

3.2.4 Análises dos dados obtidos no citômetro de fluxo

Os dados obtidos no citômetro de fluxo foram analisados usando Flowjo 7.6.5 (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA). Através do gráfico de dispersão puntual tamanho versus granulosidade foi selecionada a população de linfócitos e analisada a intensidade média de fluorescência das moléculas pSTATs (Figura 3A). Primeiramente, foi analisada a intensidade de expressão de pSTATs na população de linfócito total (Figura 3B). Em seguida, foi analisada qual subpopulação de linfócitos estava comprometida com a expressão das pSTATs. Então, foram divididas as subpopulações de linfócitos em CD45RA⁻ (células de memória/experientes) e CD45RA⁺ (células virgens) (Figura 3C).

3.2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t student pareado ou não quando a distribuição foi normal e o teste de Wilcoxon ou Mann-Whitney quando os dados apresentavam distribuição não normal. Para o teste de correlação foi utilizado o teste de Spearman. Os dados foram considerados significativos quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0®.

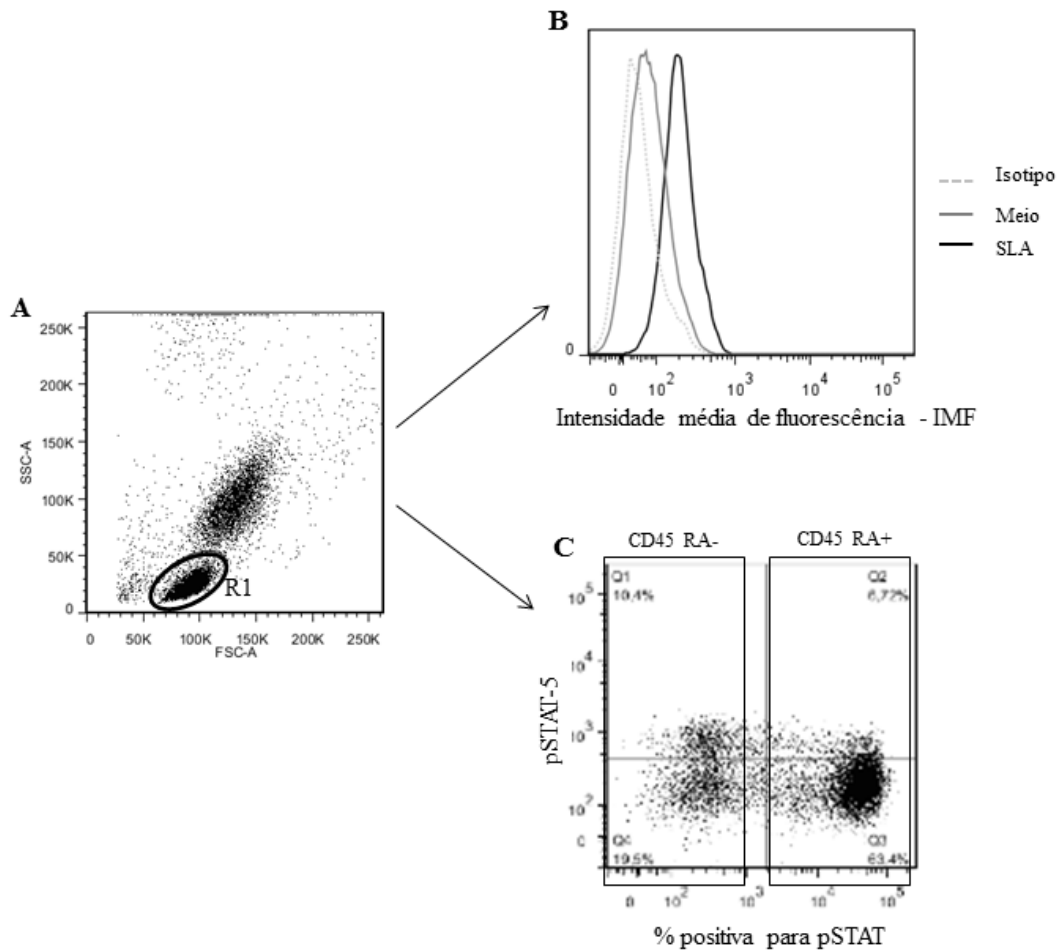


Figura 3: Gráfico de dispersão puntual (A e C) e histograma (B) representativos da estratégia de análise em linfócitos. A) População de linfócitos selecionados (Região R1) de acordo com os parâmetros morfológicos, tamanho *versus* granulosidade (FSCxSSC). B) Após a primeira seleção, foram gerados gráficos de histogramas avaliando-se a intensidade de expressão dos marcadores de interesse no estudo para cada condição. C) Gráfico de dispersão puntual para análise da frequência das pSTATs nas subpopulações de linfócitos CD45RA⁻ (experientes) e CD45RA⁺ (células virgens) (Figura 2C).

4. RESULTADOS

4.1 Resultados referentes à 1ª parte dos objetivos

4.1.2 Curva de crescimento dos parasitos

Uma curva de crescimento foi determinada para cada cepa utilizada nos experimentos de infecção, para que os parasitos fossem coletados no final da fase logarítmica/início da fase estacionária de crescimento, período em que a maioria dos parasitos estão em sua fase infectiva metacíclica. Foi observado que a fase estacionária começa no 6º dia para todas as cepas (Figuras 4A e B). Ainda, foi observado que o número de parasitos no início da fase estacionária foi diferente entre as cepas de *L. chagasi* (Figura 4A). Comparando-se entre as cepas de *L. chagasi* e *L. braziliensis*, foi observado que o número máximo de parasitos foi de 2×10^8 e, no caso de *L. braziliensis*, foi de aproximadamente 1×10^7 .

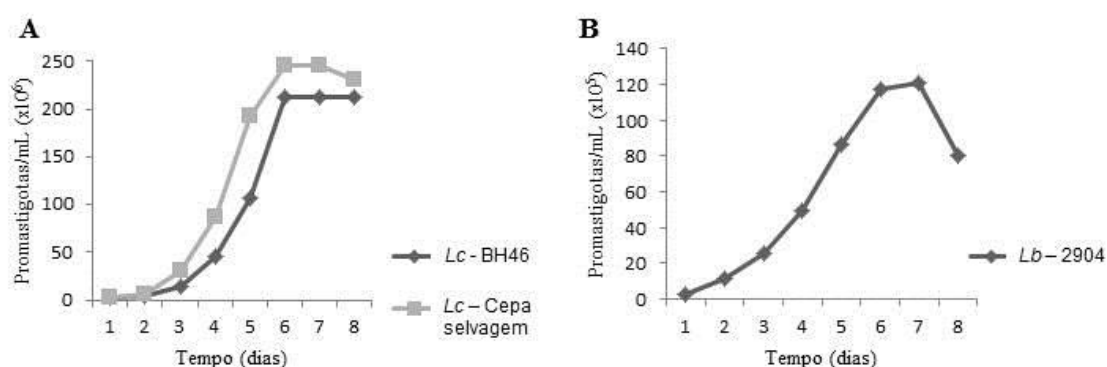


Figura 4: Curva de crescimento das promastigotas das cepas de *Leishmania chagasi* (A) e *Leishmania braziliensis* (B) durante 10 dias de cultura em meio Schneider. Curva realizada de acordo com protocolo descrito em materiais e métodos.

4.1.3 Infecção *in vitro*

Com o objetivo de verificar se grande parte das formas promastigotas estavam na fase infectiva metacíclica, retiramos uma alíquota da cultura de *Leishmania* e analisamos o tamanho *versus* granulosidade (FSCxSSC) no citômetro de fluxo adquirindo 10.000 eventos. A análise realizada foi de acordo com (Saraiva et al. 2005), que sugere que a forma promastigota metacíclica apresenta um corpo celular menor e mais estreito quando comparado com a fase procíclica. Os resultados mostraram que a

cepa *Lb* 2904 apresentava 78,1% de promastigotas metacíclicas, a cepa *Lc* selvagem 79,4%, e a cepa *Lc* BH46 apresentava 77,8% (Figura 5). Dessa forma, foi demonstrado que a frequência de promastigotas metacíclicas foi semelhante entre as cepas.

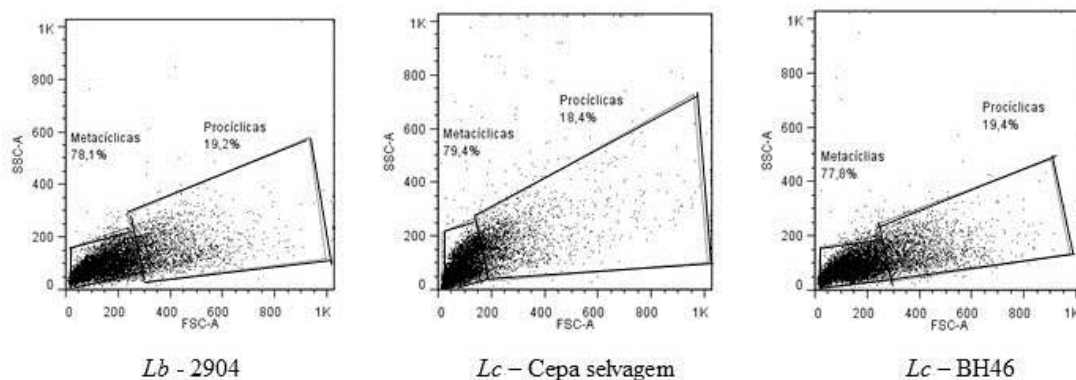


Figura 5: Gráficos representativos de dispersão puntual em tamanho *versus* granulosidade da análise da cultura de *Leishmania*. As fases metacíclicas e procíclicas (separadas pelas duas populações, respectivamente) das cepas de *Leishmania*, Cepa *Lb* 2904, Cepa *Lc* selvagem e *Lc* BH46, respectivamente, foram separadas pelo tamanho *versus* granulosidade no citômetro de fluxo.

4.1.4 Análise da infecciosidade das subpopulações de monócitos pelas diferentes cepas de *Leishmania*

Para determinar o perfil de infecciosidade de cada isolado de *Leishmania*, as formas promastigotas de *L. braziliensis* (*Lb* 2904), *L. chagasi* (*Lc* cepa selvagem) e *L. chagasi* (*Lc* BH 46) foram marcadas com CFSE e incubadas *in vitro* com CMSP. Depois de 4 horas de infecção, as células foram lavadas e marcadas com anti-CD14 para determinar a porcentagem de células infectadas após contato *in vitro* com os parasitos (Figura 6B). Além disso, em paralelo, as culturas foram mantidas por um total de 16 horas de infecção e utilizadas para avaliar as moléculas de superfície, expressão de citocinas e controle de infecção.

A infecção foi determinada pela porcentagem de células CFSE⁺ dentro da seleção de monócitos e dentro das subpopulações baseadas na expressão do CD14 (Figura 6B). Após 4 horas de infecção, a porcentagem de monócitos infectados CFSE⁺ por *L. braziliensis* e cepas de *L. chagasi*, foram estatisticamente equivalentes (Figura 7A). Entretanto, após 16 horas de infecção foi observada uma pequena diferença na intensidade de infecção, com a frequência de monócitos infectados por *L. braziliensis*

maior que infectadas por *L. chagasi* (Figura 7B). Os resultados mostraram uma diferença na intensidade de marcação pelo CFSE entre as cepas de *L. braziliensis* e *L. chagasi* (Figura 6A). Houve uma maior intensidade de marcação na cepa de *Lb 2904* em relação às outras cepas. Entretanto, essa diferença de marcação não reflete uma diferença na porcentagem dos monócitos infectados entre as três cepas quando são considerados todos os monócitos infectados CFSE⁺ (Figuras 6A, 6B, 7A, 7B).

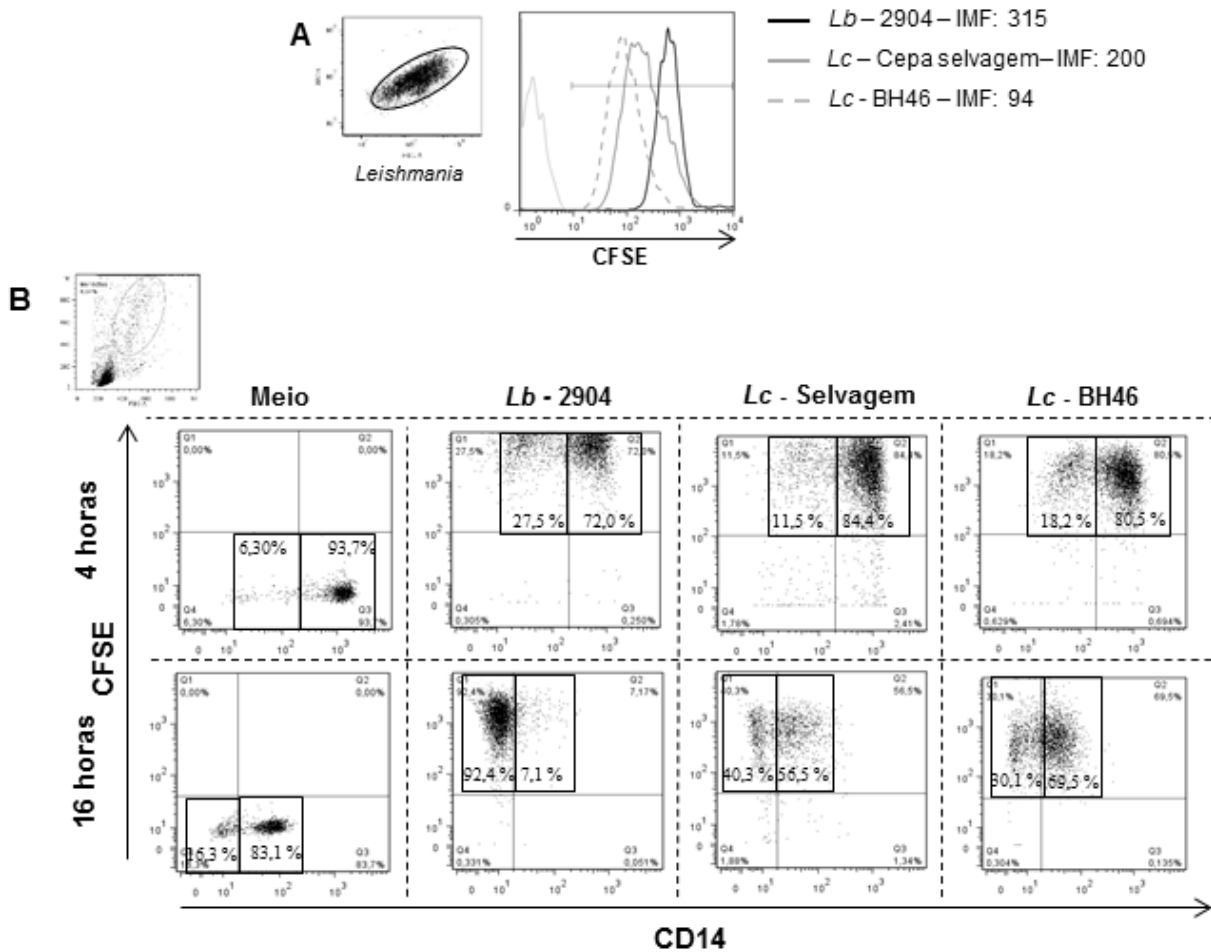


Figura 6: Estratégia de seleção de população e determinação da intensidade de infecção de monócitos derivados de CMSP utilizando parasitos marcados com CFSE. O painel A mostra uma marcação representativa da intensidade média de fluorescência (IMF) de *Leishmania* marcada com CFSE. Na população de *Leishmania* foram selecionados os parâmetros FSCxSSC, em seguida, foi determinado IMF em um histograma de fluorescência FL1. Painel B mostra os gráficos de dispersão puntual CFSExCD14 utilizados para delimitar os quadrantes para determinação da porcentagem de monócitos infectados utilizando monócitos CFSE⁺ expressando CD14⁺ ou não (CD14⁻). Este é um experimento representativo usando um doador.

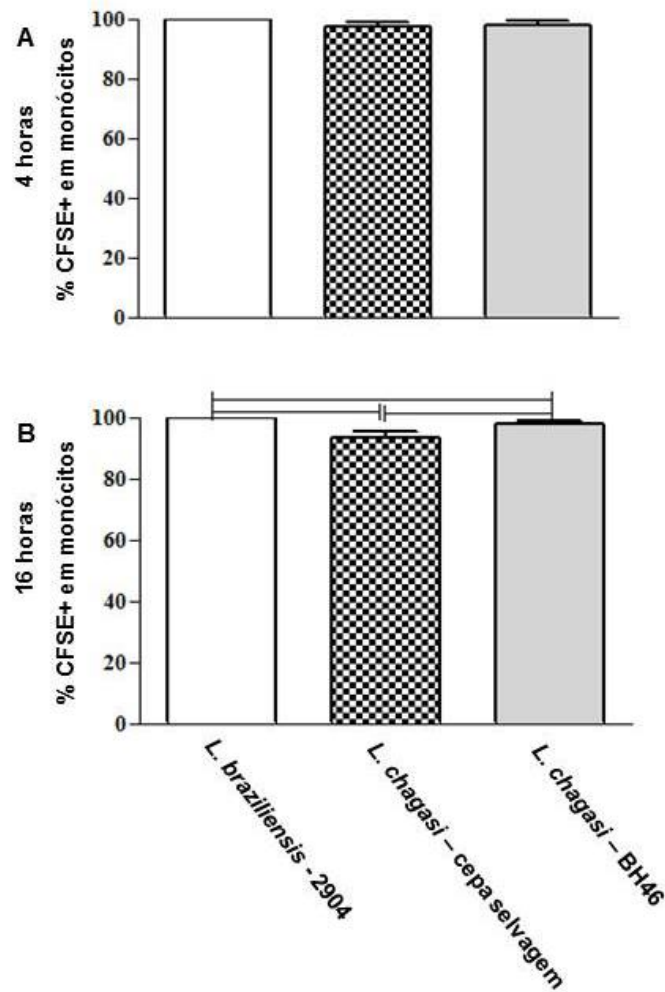


Figura 7: Determinação da frequência de monócitos infectados por diferentes cepas de *Leishmania* após 4 horas e 16 horas de cultura. (A) mostra a porcentagem de monócitos infectados em 4 horas, determinado pelos monócitos CFSE⁺ (n=4) e (B) após 16 horas (n=6). Resultados são expressos como média e desvio padrão. A barra horizontal indica uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as cepas.

4.1.4 Análise da expressão do marcador CD14 em monócitos infectados com as diferentes cepas de *Leishmania*

Posteriormente, foi avaliada a expressão da molécula CD14 nos monócitos após 4 horas e 16 horas de infecção com as diferentes cepas, assim como em monócitos de cultura não infectada. Os resultados mostraram, na cultura de 4 horas, que houve um aumento na porcentagem de monócitos CD14⁻ infectados com qualquer uma das cepas quando comparados com os monócitos da cultura controle. Também foi observada uma diminuição na porcentagem de células CD14⁺ na cultura infectada com as diferentes cepas quando comparadas com a cultura não infectada (Figura 8A). Entretanto, na cultura de 16 horas, foi observada uma modulação negativa mais drástica de CD14 na cultura infectada pela *Lb* 2904 comparada com a cultura infectada com as outras cepas (Figura 8B).

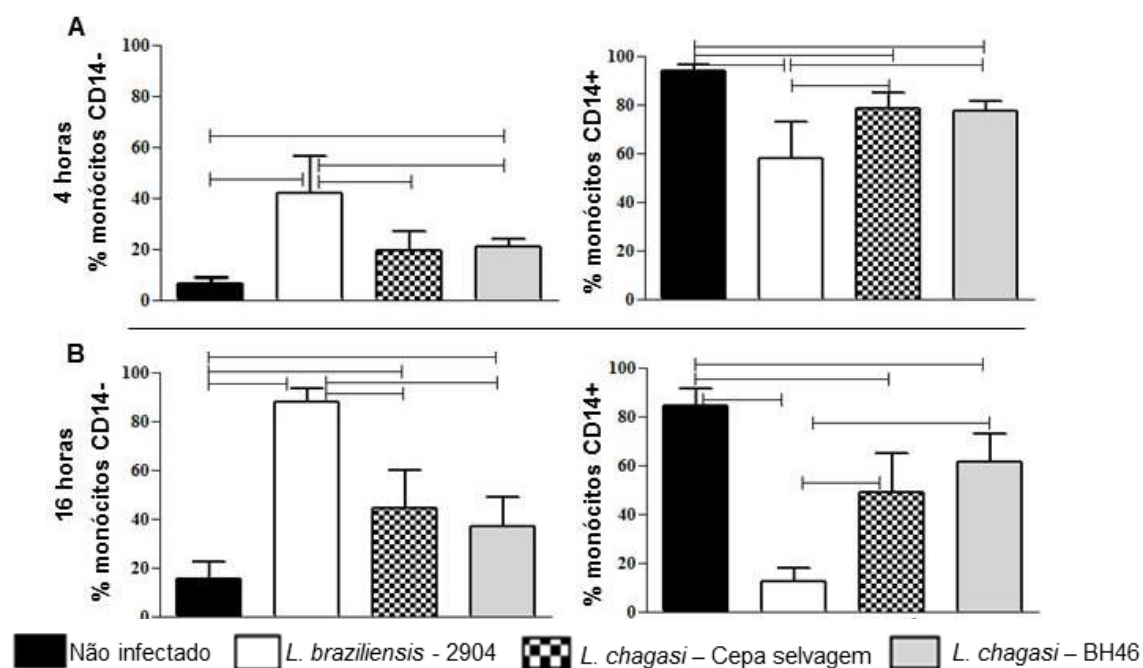


Figura 8: Análise da expressão de CD14 em monócitos infectados ou não com as diferentes cepas de *Leishmania* com 4 horas e 16 horas após a infecção. (A) mostra a porcentagem de CD14⁺ e CD14⁻ em monócitos infectados (CFSE⁺) com 4 horas de infecção com os três isolados e células controle (n=4) e (B) mostra a mesma medida com 16 horas de infecção (n=6). Resultados são expressos como média e desvio padrão. A barra horizontal indica uma diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre as diferentes condições.

4.1.5 Avaliação da expressão de TLR 2 e TLR 9 em monócitos infectados com as diferentes cepas de *Leishmania*

No nosso trabalho foi avaliada a intensidade de expressão de TLR em monócitos infectados ou não com as diferentes cepas de *Leishmania* em 16 horas (Figuras 9A e 9B). A análise da intensidade de expressão de TLR2 em monócitos CD14⁻ mostrou que houve uma maior intensidade de expressão de TLR2 em monócitos infectados pela cepa *Lb* 2904. No entanto, foi observado que os monócitos infectados pela cepa *Lc* selvagem tiveram uma menor expressão de TLR2 quando comparados com os monócitos infectados com as cepas *Lb* 2904 e *Lc* BH46. Importante ressaltar que os monócitos infectados com as três cepas tiveram uma intensidade de expressão maior que a cultura não infectada (Figura 9A).

Quando foi analisada a intensidade média de fluorescência de TLR2 em monócitos CD14⁺, foi possível perceber que os monócitos infectados pela cepa da espécie *L. braziliensis* 2904, apresentaram uma maior expressão desse receptor quando comparados com os monócitos infectados com as duas cepas de *L. chagasi* (Figura 9B). Além disso, foi perceptível que, independentemente da cepa que os monócitos foram infectados, houve uma maior expressão de TLR2 em monócitos infectados quando comparado com os monócitos da cultura não estimulada (Figura 9B).

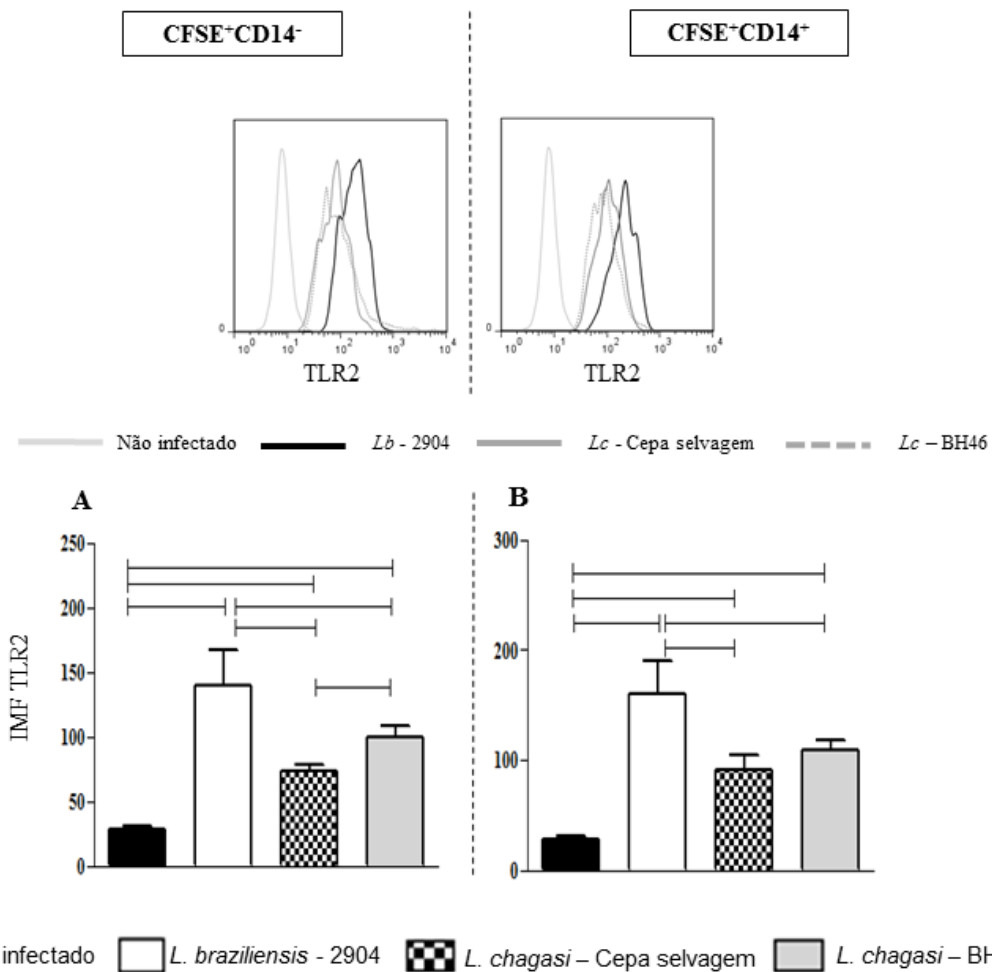


Figura 9: Avaliação da intensidade média de fluorescência de expressão de TLR2 em monócitos CD14⁻ (A) e CD14⁺ (B) infectados ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*. Resultados são expressos como média e desvio padrão (n=6). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

Quando foi analisada a intensidade de expressão de TLR9 em monócitos infectados, observou-se que os monócitos CD14⁻ infectados com a cepa *Lb* 2904 apresentaram uma maior expressão desse receptor em relação aos monócitos infectados com as outras cepas e a cultura de monócitos não infectada (Figura 10A). Quando foi analisada a intensidade de expressão de TLR9 em monócitos infectados com as diferentes cepas de *L. chagasi*, os resultados mostraram que os monócitos infectados com a cepa *Lc* BH46 expressaram maiores níveis de intensidade de expressão TLR9 quando comparados com os monócitos infectados com a cepa selvagem (Figura 10A). No entanto, os monócitos infectados com as cepas *L. chagasi* apresentaram uma maior intensidade de expressão de TLR9 quando comparados com a cultura controle.

Posteriormente, foi analisada a intensidade média de fluorescência de TLR9 em monócitos CD14⁺ infectados com as diferentes cepas de *Leishmania*. Analisando os resultados, foi notório que os monócitos CD14⁺ infectados com a cepa *Lb* 2904 apresentaram uma maior expressão desse receptor quando comparados com os monócitos infectados com as cepas selvagem e a *Lc* BH46, ambas da espécie *L. chagasi* (Figura 10B). Novamente quando analisados os monócitos CD14⁺ infectados com as três cepas de *Leishmania*, foi observado que a intensidade de expressão de TLR9 foi maior quando comparado com os monócitos da cultura não estimulada (Figura 10B). A percentagem de monócitos expressando TLR2 e TLR9 foi acima de 95% nos monócitos infectados com as três cepas (dados não mostrados).

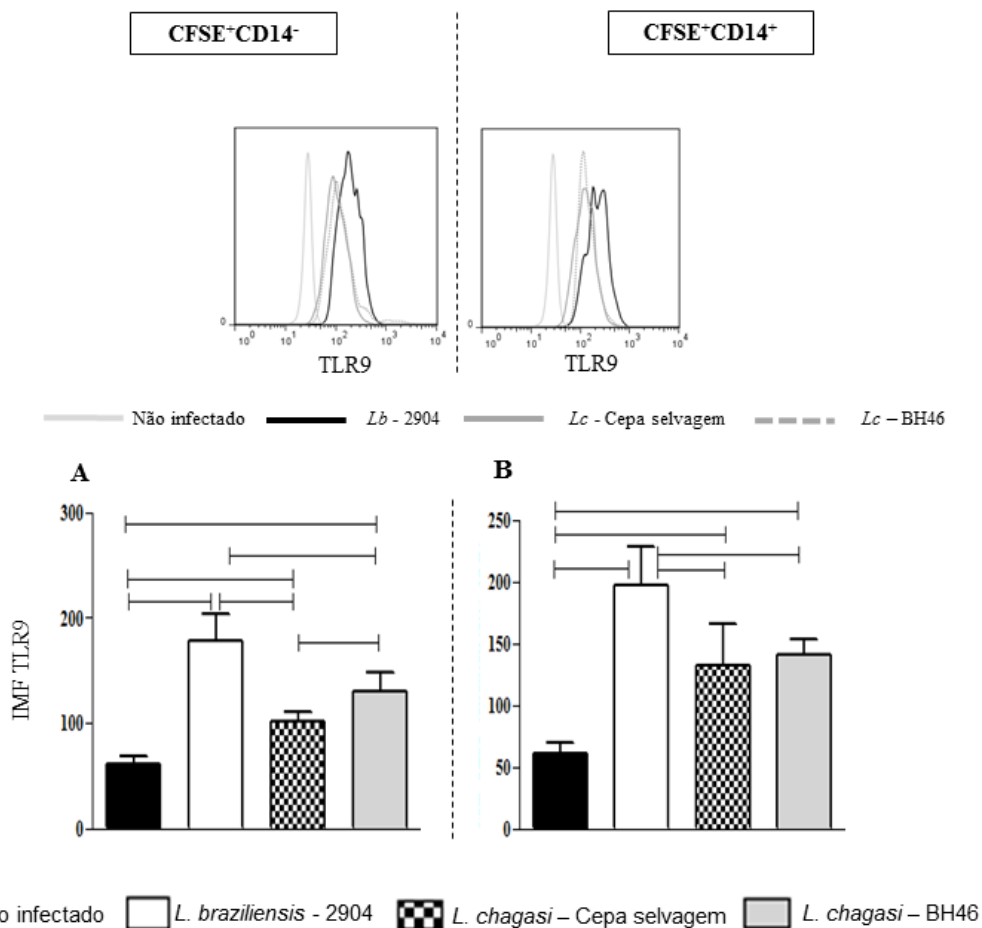


Figura 10: Avaliação da intensidade média de fluorescência de expressão de TLR9 em monócitos CD14⁻ (A) e CD14⁺ (B) infectados ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*. Resultados expressos em média e desvio padrão (n=6). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre as diferentes condições.

4.1.6 Análise da expressão da molécula de ativação HLA-DR em monócitos CD14 infectados com as diferentes cepas de *Leishmania*

Quando analisada a intensidade de expressão da molécula HLA-DR em monócitos CD14⁻ infectados com as diferentes cepas, foi observada uma maior frequência de monócitos expressando HLA-DR em cultura de monócitos infectados com a cepa *Lb* 2904, tanto em relação ao controle, como em relação a cultura de monócitos infectados com as outras cepas. Não foi observada diferença estatística na expressão de HLA-DR em monócitos CD14⁻ quando infectados com as cepas de *L. chagasi* e a cultura não infectada (Figura 11A).

Em seguida, foi analisada a intensidade de expressão da molécula de ativação HLA-DR nos monócitos CD14⁺ infectados ou não com as diferentes cepas. Foi evidenciado que os monócitos infectados com a cepa *Lb* 2904 apresentaram uma maior intensidade de expressão da molécula HLA-DR comparando-se com as cepas *Lc* selvagem e a *Lc* BH46. Além disso, os resultados mostraram que a intensidade de expressão de HLA-DR em monócitos infectados com as diferentes cepas foi maior que em monócitos da cultura não estimulada, exceto pela cepa *Lc* selvagem (Figura 11B). As percentagens de monócitos expressando HLA-DR foram maiores que 95% em monócitos infectados com as diferentes cepas e em monócitos da cultura não infectada (dados não mostrados).

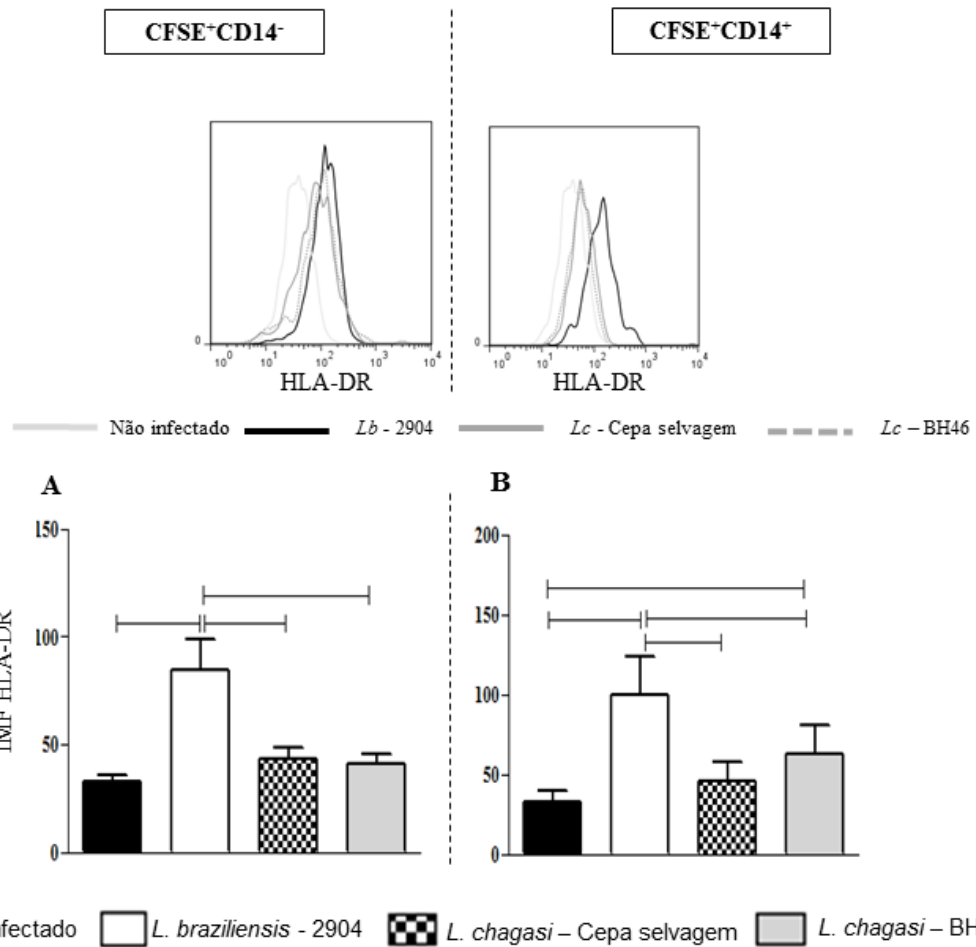


Figura 11: Avaliação da intensidade média de fluorescência da expressão da molécula de ativação HLA-DR em monócitos CD14⁻ (A) e CD14⁺ (B) infectados ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*. Resultados expressos em média e desvio padrão (n=6). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

4.1.7 Avaliação da expressão das moléculas co-estimuladoras em monócitos infectados com as diferentes cepas de *Leishmania*

Nesta parte do trabalho, o objetivo foi avaliar a expressão dos ligantes das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86. Primeiramente, foi analisada a percentagem de monócitos CD14⁻ expressando a molécula co-estimuladora CD80. Foi encontrada uma frequência mais elevada de monócitos infectados com a cepa *Lc* BH46 expressando a molécula CD80 quando comparado com os monócitos infectados com as outras cepas e a cultura não infectada (Figura 12A).

Quando foi analisada a percentagem de expressão da molécula CD80 em monócitos CD14⁺, foi possível perceber de maneira semelhante com os resultados encontrados nos monócitos CD14⁻, que os monócitos infectados com a cepa *Lc* BH46 tiveram uma maior expressão de CD80 em relação aos monócitos infectados com as outras cepas e a cultura não infectada (Figura 13B).

Posteriormente, foi avaliada a intensidade de expressão da molécula CD80 em monócitos CD14⁻. Os resultados mostraram que os monócitos infectados com a cepa *Lc* BH46 apresentaram uma maior intensidade de expressão de CD80, tanto em relação aos monócitos infectados com as outras cepas, como em relação aos monócitos não infectados. Além disso, foi possível observar também, que os monócitos infectados com a cepa *Lc* selvagem apresentaram uma intensidade de expressão da molécula CD80 maior que os monócitos não infectados (Figura 12C). Diferentemente, quando observada a intensidade de expressão de CD80 pelos monócitos CD14⁺, não foi observada diferença estatística entre os monócitos infectados pelas diferentes cepas. Entretanto, ficou evidente, uma maior expressão de CD80 pelos monócitos CD14⁺ infectados com as cepas de *L. chagasi* quando comparados com a cultura controle (Figura 12D).

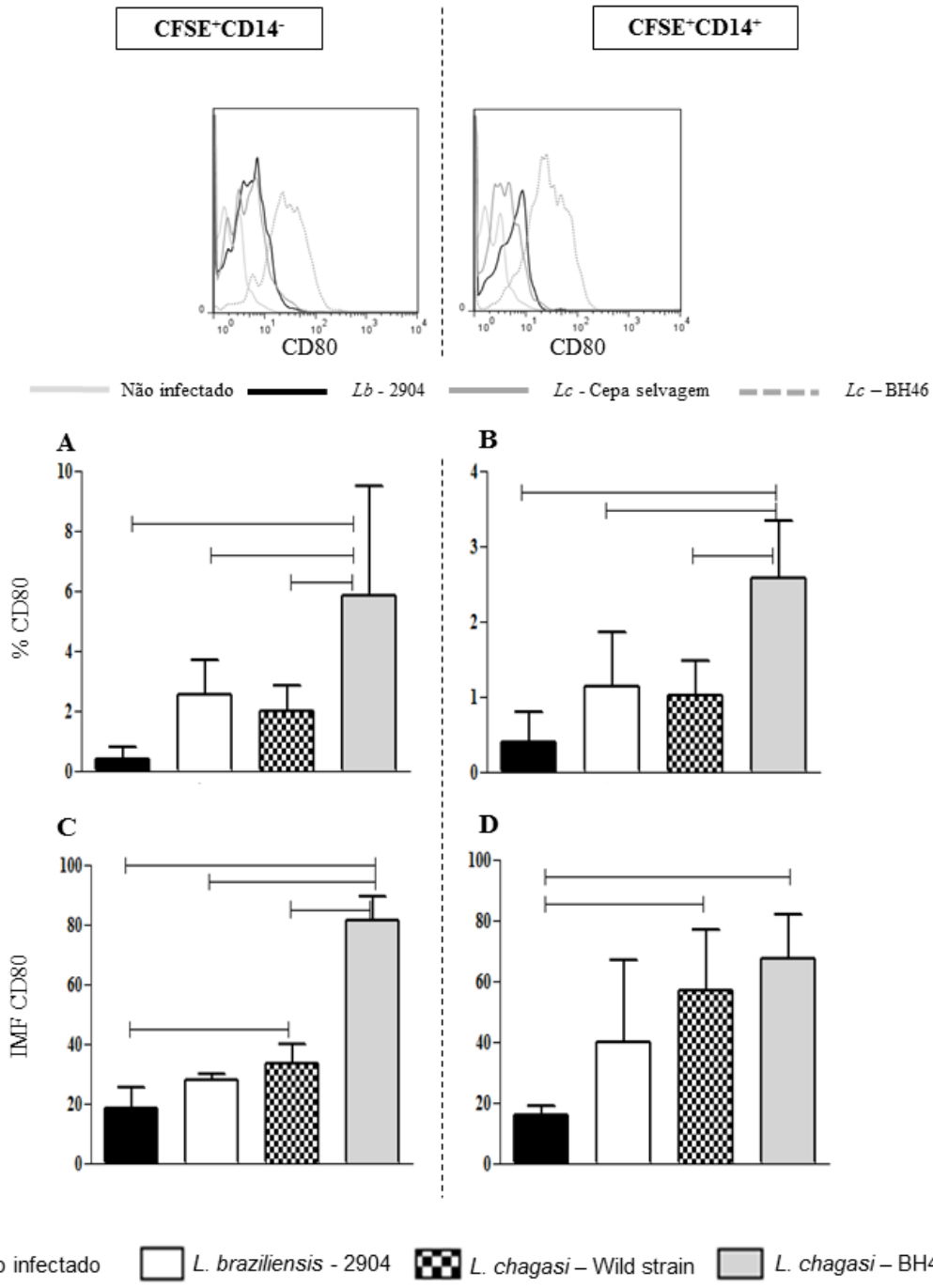


Figura 12: Avaliação da expressão da molécula co-estimuladora CD80 em monócitos infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania*. Frequência de monócitos A) CD14⁻ e B) CD14⁺ infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania* expressando a molécula CD80. Intensidade média de fluorescência de expressão de CD80 em monócitos C) CD14⁻ e D) CD14⁺ infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania*. Resultados expressos em média e desvio padrão (n=6). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

Em seguida, foi avaliada a porcentagem de monócitos expressando a molécula CD86. Foi encontrado que os monócitos CD14⁻ infectados com a cepa *Lb* 2904 e monócitos não infectados apresentaram uma frequência maior de expressão de CD86 quando comparados com monócitos infectados com as cepas de *L. chagasi* (Figura 13A). Entretanto, quando foi avaliada a porcentagem de monócitos CD14⁺ expressando CD86, foi observado que os monócitos infectados com a cepa *Lb* 2904 tiveram uma maior expressão de CD86 quando comparados com os monócitos infectados com as outras cepas e a cultura de monócitos não infectados (Figura 13B).

Posteriormente, foi analisada a intensidade de expressão da molécula co-estimuladora CD86 nos monócitos CD14⁻. Os resultados mostraram que os monócitos infectados com a cepa *Lb* 2904 tiveram uma maior intensidade de expressão da molécula CD86 quando comparados com os monócitos infectados com as cepas de *L. chagasi*. No entanto, não houve diferença comparando-se a cultura infectada com a cepa 2904 e a cultura de monócitos não infectados. Além desses resultados, foi percebido que os monócitos CD14⁻ infectados com a cepa selvagem tiveram uma menor expressão de CD86 em relação aos monócitos infectados com a cepa *Lb* 2904 e a cultura não infectada (Figura 13C). Resultado semelhante foi encontrado em monócitos CD14⁺ quando avaliada a intensidade de expressão de CD86. Os resultados mostraram que os monócitos infectados com a cepa selvagem tiveram uma menor expressão de CD86 quando comparado com os monócitos infectados com as cepas *Lb* 2904 e cepa *Lc* BH46 (Figura 13D).

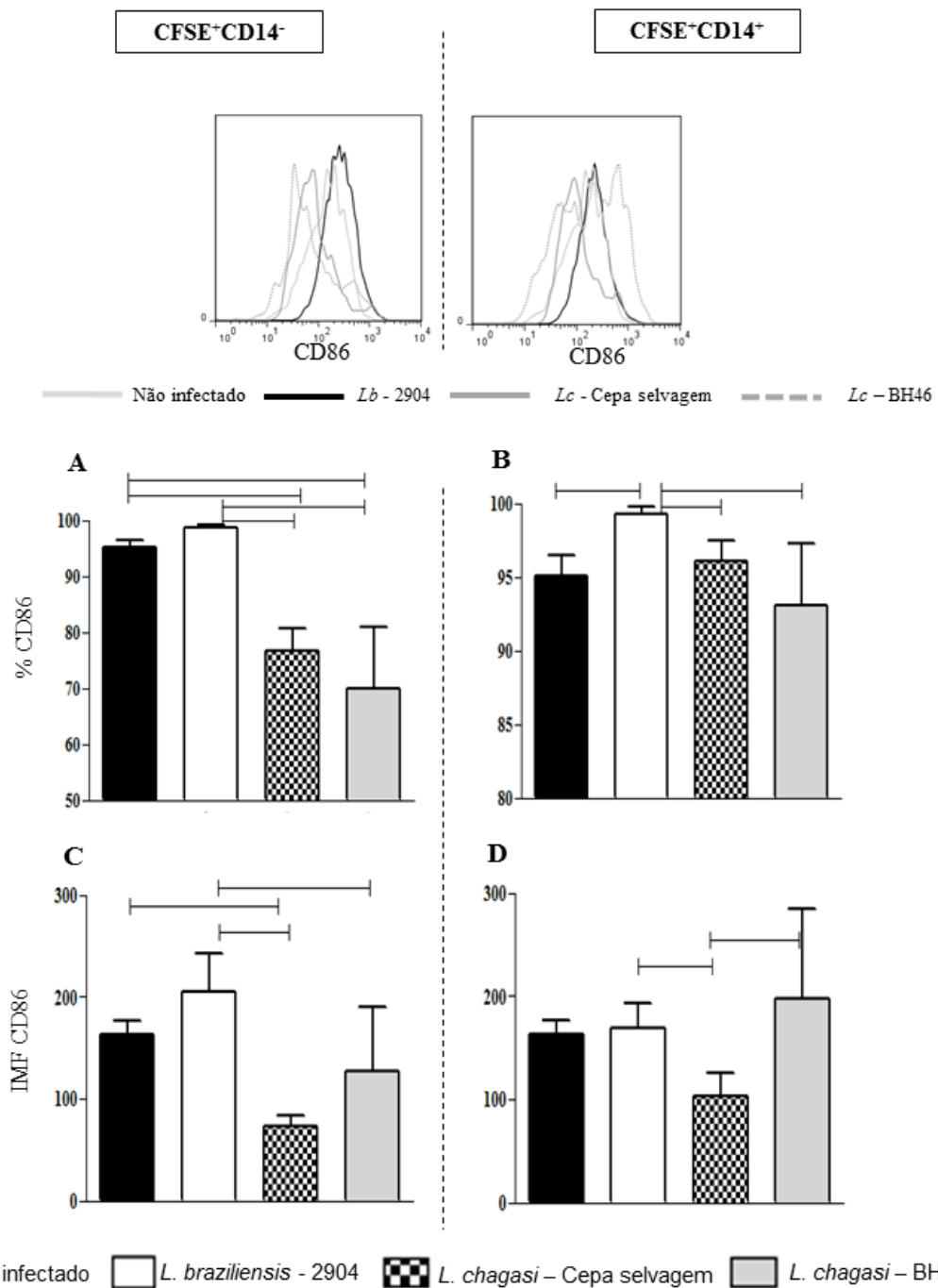


Figura 13: Avaliação da expressão da molécula co-estimuladora CD86 em monócitos infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania*. Frequência de monócitos CD14⁻ (A) e CD14⁺ (B) infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania* expressando a molécula CD86. Intensidade média de fluorescência de expressão de CD86 em monócitos CD14⁻ (C) e CD14⁺ (D) infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania*. Resultados expressos em média e desvio padrão (n=6). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

4.1.8 Avaliação da expressão intracelular de citocinas em monócitos infectados com diferentes cepas de *Leishmania*

Nesta etapa, foi avaliada a frequência de monócitos infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania* expressando citocinas intracelulares. Neste estudo, foram avaliadas as principais citocinas produzidas por monócitos envolvidas na resposta imune tanto na leishmaniose tegumentar quanto na forma clínica visceral.

Na análise da expressão de IL-12/IL-23p40 em monócitos CD14⁻ infectados com as diferentes cepas de *Leishmania* e cultura de monócitos não infectados, foi observado que mais de 99% dos monócitos infectados com as três cepas de *Leishmania* expressavam esta citocina. Estes valores foram maiores em relação à cultura controle (Figura 14A). O mesmo foi observado quando analisada a frequência da expressão de IL-12/IL-23p40 em monócitos CD14⁺, o que demonstrou mais uma vez que não houve diferença na expressão dessa proteína quando analisada em monócitos infectados com as cepas de *Leishmania* (Figura 14B).

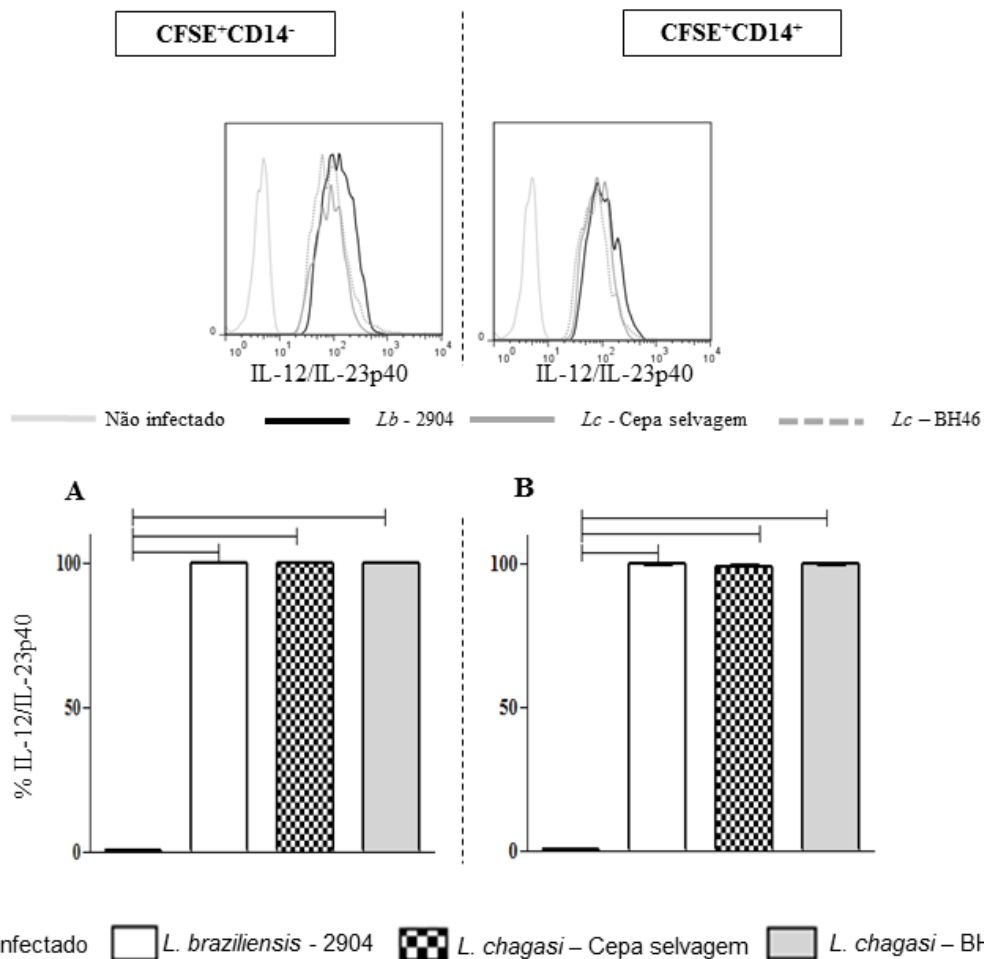


Figura 14: Avaliação da frequência de monócitos infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania* expressando IL-12/IL-23p40. Frequência de monócitos CD14⁻ (A) e CD14⁺ (B) infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania* expressando IL-12/IL-23p40. Resultados são expressos em média e desvio padrão (n=6). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

Posteriormente, foi avaliada em monócitos CD14⁻, a frequência de monócitos infectados ou não com *Leishmania* expressando TNF- α . Os resultados mostraram que os monócitos infectados com a cepa *Lb* 2904 tiveram uma maior expressão de TNF- α quando comparados com os monócitos infectados com as outras cepas e a cultura controle. Além disso, foi observado que os monócitos infectados com a cepa selvagem tiveram uma maior expressão de TNF- α comparado com a cultura controle (Figura 15A). Entretanto, quando foi analisada a expressão de TNF- α em monócitos CD14⁺, foi observado que os monócitos infectados com as cepas *Lb* 2904 e *Lc* selvagem apresentaram uma maior expressão de TNF- α quando comparado com a cepa *Lc* BH46 e a cultura controle. De maneira interessante, houve uma diferença estatística na

expressão dessa citocina entre as cepas de *L. chagasi*, sendo evidenciado que a cepa *Lc* selvagem induz expressão maior de TNF- α do que a cepa *Lc* BH46 (Figura 15B).

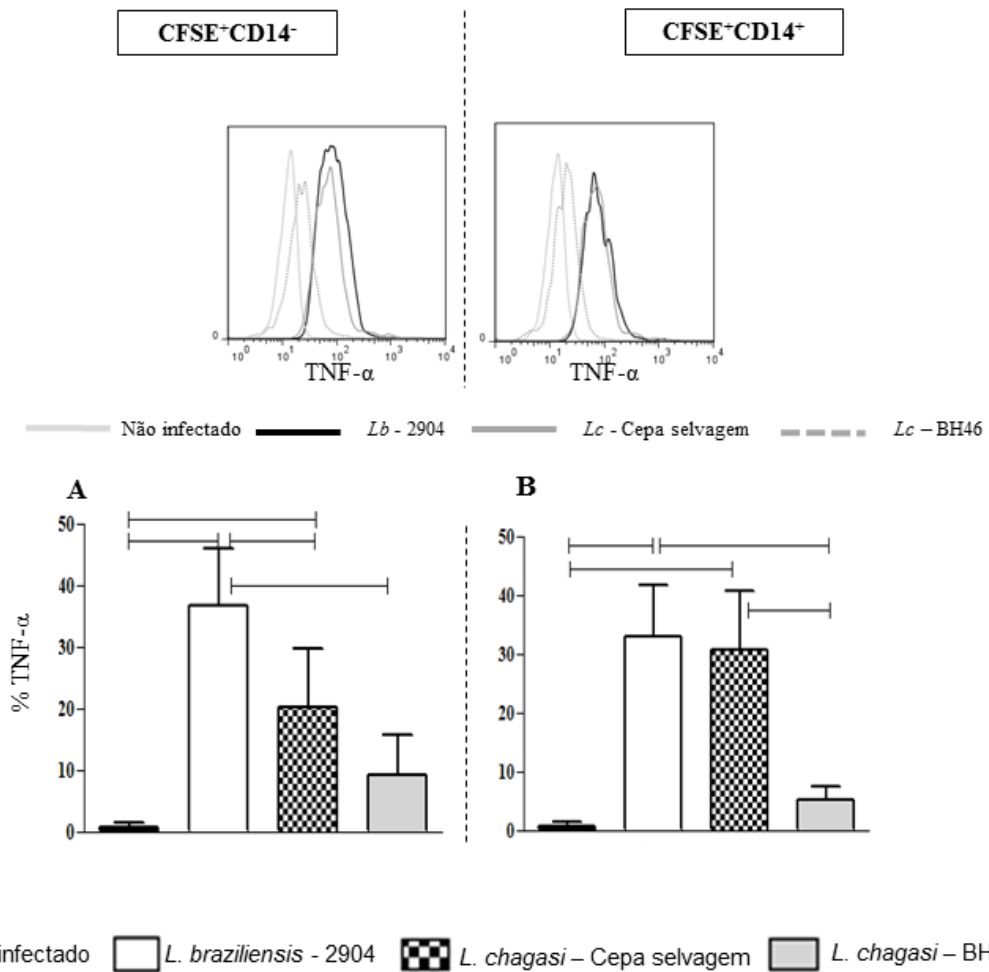


Figura 15: Avaliação da frequência de monócitos infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania* expressando TNF- α . Frequência de monócitos CD14⁻ (A) e CD14⁺ (B) infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania* expressando TNF- α . Resultados são expressos em média e desvio padrão (n=6). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa (p \leq 0,05) entre as diferentes condições.

Em seguida, foi analisada a frequência de monócitos CD14⁻ expressando IL-10, e foi possível perceber que os monócitos infectados com as 3 cepas tiveram uma maior expressão dessa citocina quando comparados com a cultura controle. Entretanto, não houve diferença estatística na expressão de IL-10 comparando-se entre os monócitos CD14⁻ infectados com as diferentes cepas de *Leishmania* (Figura 16A). Quando avaliada a expressão de IL-10 nos monócitos CD14⁺, foi observado que as cepas *Lb* 2904 e *Lc* selvagem levaram a uma maior expressão dessa citocina comparadas à cultura controle. De forma interessante, os monócitos infectados com a cepa *Lc* BH46 tiveram uma menor expressão de IL-10 em relação aos monócitos infectados com a cepa *Lc* selvagem (Figura 16B).

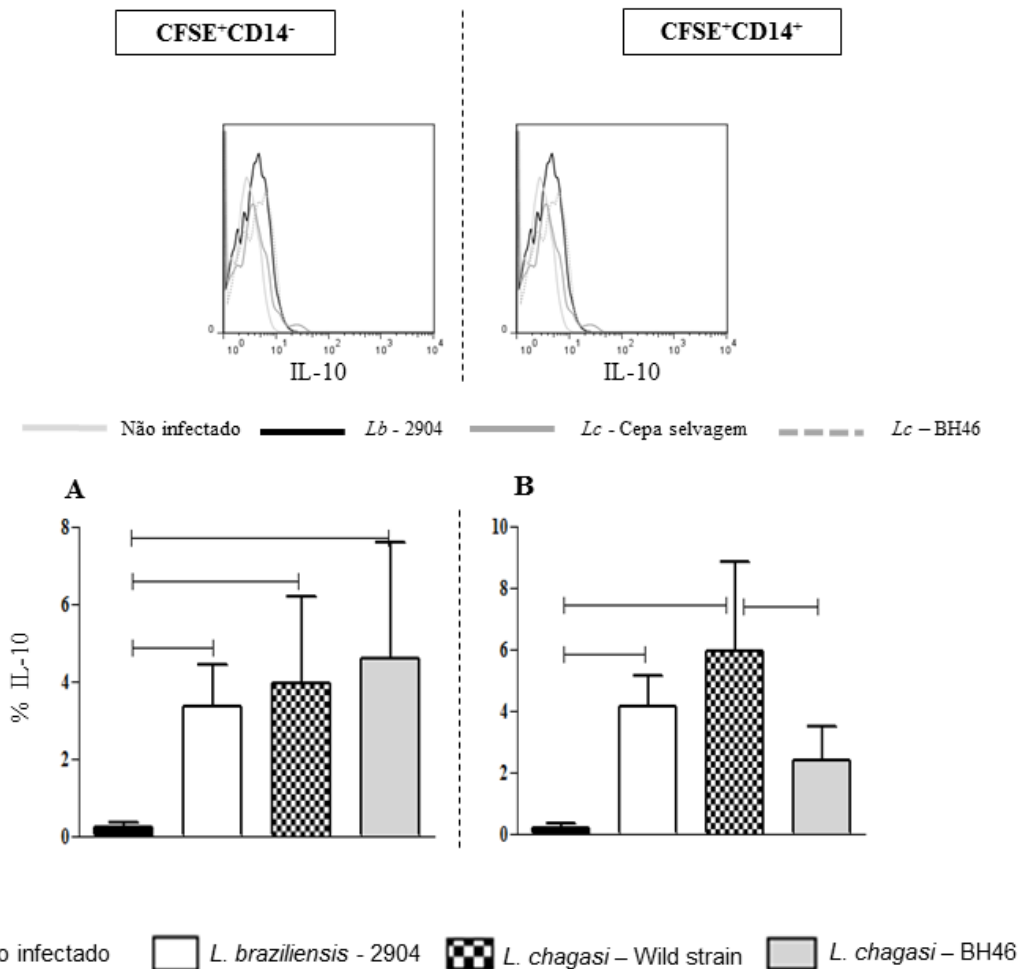


Figura 16: Avaliação da frequência de monócitos infectados ou não com diferentes cepas de *Leishmania* expressando IL-10. Frequência de monócitos CD14⁻ (A) e CD14⁺ (B) infectados com diferentes cepas de *Leishmania* expressando IL-10. Resultados são expressos em média e desvio padrão (n=6). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

Com o objetivo de se analisar o microambiente da resposta imune predominantemente encontrado nos monócitos infectados com as diferentes cepas, foi realizada a razão entre TNF- α (caracterizada com citocina inflamatória) e IL-10 (caracterizada com citocina anti-inflamatória). Foi observada uma maior razão % TNF- α /IL-10 quando os monócitos foram infectados com a cepa *Lb* 2904 em relação as outras cepas, demonstrando dessa forma, que essa cepa apresenta um perfil mais inflamatório. Além disso, foi possível perceber que os monócitos infectados com a cepa selvagem tiveram uma maior razão TNF- α /IL-10 quando comparados com os monócitos infectados com a cepa *Lc* BH46. Assim, os resultados mostraram que, entre as cepas de *L. chagasi*, a cepa selvagem apresenta um perfil mais inflamatório (Figura 17).

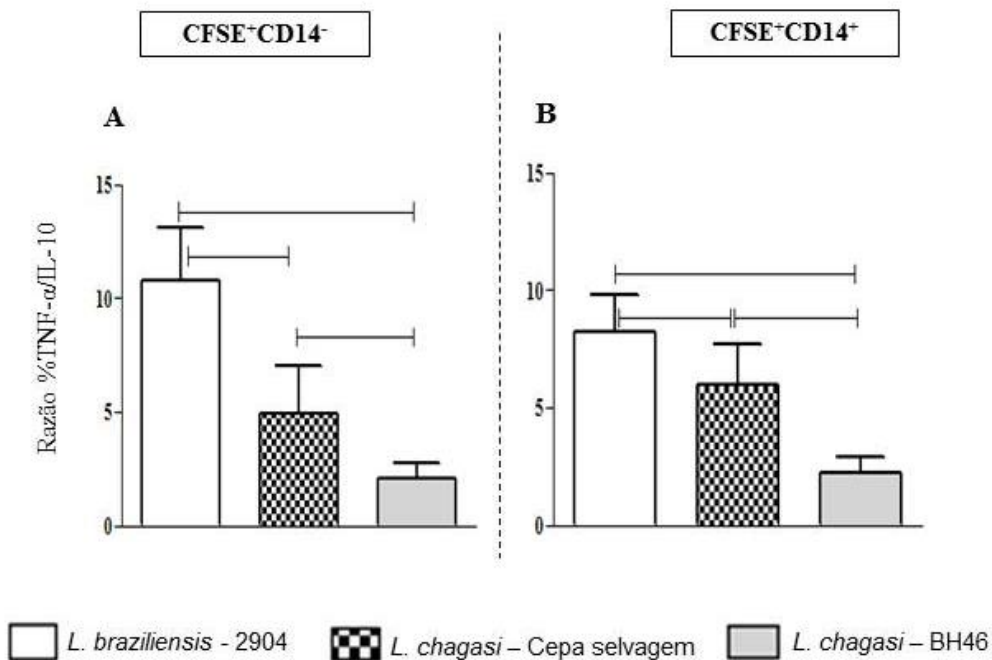


Figura 17: Razão da expressão de TNF- α /IL-10 em monócitos infectados com diferentes cepas de *Leishmania*. Razão da frequência de monócitos CD14⁻ (A) e CD14⁺ (B) expressando TNF- α /IL-10 após infecção com as diferentes cepas de *Leishmania*. Resultados expressos em média e desvio padrão (n= 6). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

4.1.9 Correlações entre a expressão de TLR e a expressão de citocinas por monócitos infectados com as diferentes cepas de *Leishmania*

Buscando determinar se havia relação entre a expressão de TLR e a expressão de citocinas, foram realizadas análises de correlação entre essas variáveis. Assim, foi observada uma correlação positiva entre a intensidade média de fluorescência de TLR2 e a expressão de TNF- α e de TLR9 e TNF- α em monócitos CD14⁻ infectados pela cepa *Lb* 2904 (Figura 18A). Na população de monócitos CD14⁺, foi observada uma correlação positiva entre a intensidade de expressão de TLR2 e produção de TNF- α nos monócitos infectados com as cepas *Lb* 2904 e *Lc* selvagem (Figura 18B). Foram realizadas outras correlações com a expressão de outras citocinas e de TLR, no entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (dados não mostrados).

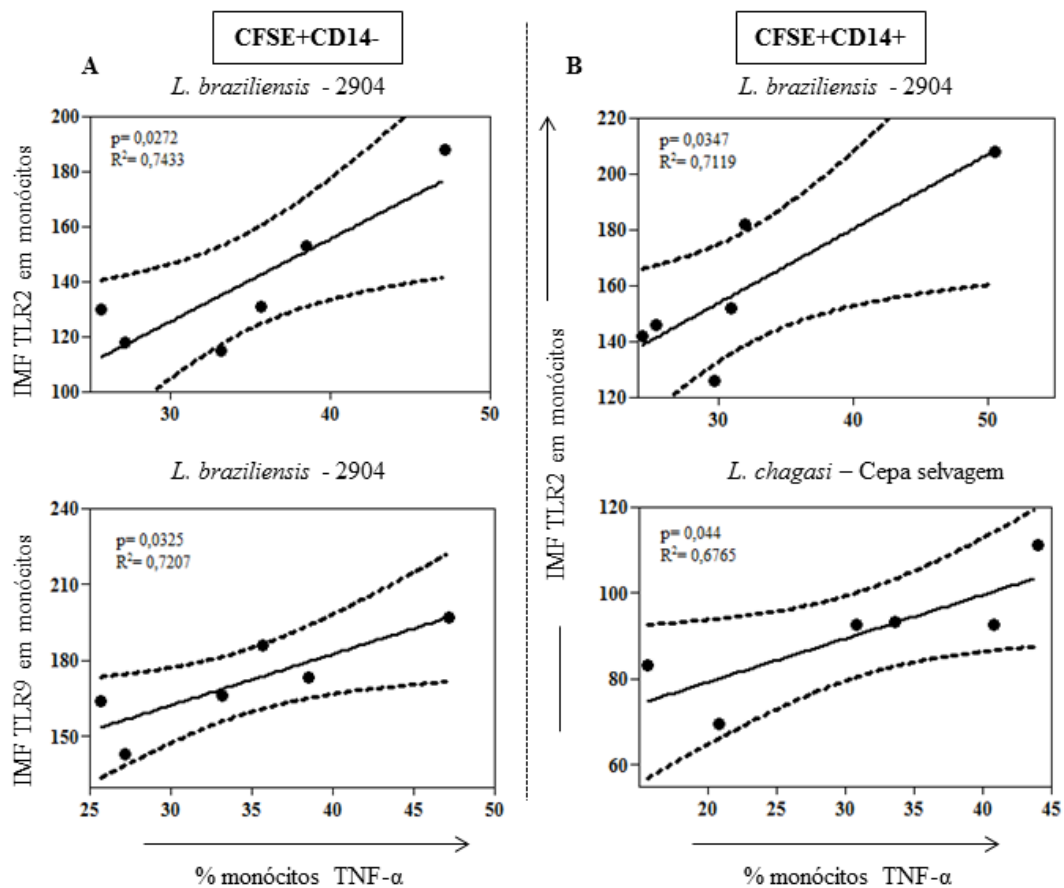


Figura 18: Análise de correlação entre a expressão de TLR2 e TLR9 com TNF- α em monócitos CD14 $^{-}$ e CD14 $^{+}$ infectados com diferentes isolados de *Leishmania*. Resultados são expressos como *scatterplots*, cada ponto representa um doador individual, mostrando correlação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) e valor R^2 entre diferentes cepas. Análise de correlação foi feita usando coeficiente de correlação de Pearson ($n=6$). A) Correlação positiva entre TLR2 $^{+}$ /TNF- α^{+} e TLR9 $^{+}$ /TNF- α^{+} em monócitos CD14 $^{-}$. Correlação positiva entre TLR2 $^{+}$ /TNF- α^{+} em monócitos CD14 $^{+}$ infectados com diferentes isolados de *Leishmania*.

4.1.10 Comparação da intensidade de expressão das diferentes moléculas entre as subpopulações de monócitos CD14 $^{+}$ e CD14 $^{-}$ infectados com as diferentes cepas de *Leishmania*

Posteriormente, foi analisado se havia diferença na intensidade de expressão das moléculas entre as subpopulações de monócitos CD14 $^{-}$ e CD14 $^{+}$ infectados com as diferentes cepas. Os resultados mostraram que, os monócitos CD14 $^{+}$ infectados com a cepa *Lb* 2904 apresentaram uma maior expressão das moléculas TLR2, TLR9 e HLA-DR em relação aos monócitos CD14 $^{-}$. Quando avaliada a expressão das moléculas nos

monócitos infectados com a cepa selvagem, foi encontrada uma maior expressão das moléculas TLR2, TLR9, CD80 e CD86 em monócitos CD14⁺ comparados com monócitos CD14⁻. Em relação a expressão de moléculas de ativação, foi observado que os monócitos CD14⁺ infectados com a cepa *Lc* BH46 apresentaram maior expressão de TLR9, HLA-DR e CD86 quando comparados com monócitos CD14⁻ (Tabela 2).

De maneira interessante, foi observado que os monócitos CD14⁺ expressaram maiores níveis de moléculas de ativação quando comparado com os monócitos CD14⁻, independente da cepa de *Leishmania* utilizada na infecção. Estas diferenças fenotípicas sugerem que estas células podem apresentar propriedade funcionais distintas.

Tabela 2. Comparação da intensidade de expressão de moléculas de ativação TLR2, TLR9, HLA-DR, CD80 and CD86 entre monócitos CD14⁻ e CD14⁺.

IMF	<i>L.b.</i> 2904		<i>L.c.</i> Cepa selvagem		<i>L.c.</i> BH46	
	CD14 ⁻	CD14 ⁺	CD14 ⁻	CD14 ⁺	CD14 ⁻	CD14 ⁺
TLR2	139.2±27.42 ^a	159.3±30.08 ^a	73.38±5.47 ^b	90.32±13.65 ^b	99.89±9.08	106.4±11.19
TLR9	178.4±25.09 ^c	197.4±30.60 ^c	101.4±9.14 ^d	131.7±34.32 ^d	130.7±16.88 ^e	141.1±11.67 ^e
HLA-DR	84.34±14.77 ^f	99.67±23.70 ^f	42.90±15.43	46.04±11.43	41.09±10.88 ^g	63.10±17.70 ^g
CD86	205.5±37.29 ^h	169.5±22.84 ^h	72.63±10.70 ⁱ	102.8±22.38 ⁱ	136.7±62.22 ^j	203.3±80.26 ^j
CD80	27.93±1.72	40.06±26.94	33.15±6.74 ^k	56.84±20.05 ^k	80.5±7.82	65.87±13.48
% TNF-α	36.76±9.21	32.84±8.92	20.06±9.60	30.56±10.16	9.25±6.30	5.17±2.28
% IL-10	3.36±1.07	4.14±0.97	3.94±2.51	5.93±2.88	4.64±2.74	2.38±1.11

* Comparações foram feitos entre as subpopulações de monócitos infectados com o mesmo isolado de *Leishmania*. Resultados são expressos como média e desvio padrão (n=6). Letras iguais representam diferença estatisticamente significativa (p≤0,05) em monócitos infectados com a mesma cepa.

4.1.11 Avaliação do controle de infecção em monócitos infectados com diferentes cepas de *Leishmania* submetidos a diluição limitante

Para determinar a habilidade de monócitos da cultura em controlar a infecção pelo parasito *Leishmania*, os monócitos de quatro doadores saudáveis foram infectados com as três cepas de *Leishmania* e, posteriormente, a cultura de monócitos foi submetida a diluição seriada em meio Schneider. O último poço positivo para *Leishmania* da cultura infectada com *Lb* 2904 (diluição 1:2187) foi determinado como 1 e, para o cálculo, do aumento ou a diminuição do número de parasitos, foi usado o último poço da diluição seriada para a cultura com as outras duas espécies de *L. chagasi*. As médias relativas das culturas de *Leishmania* de *Lc* cepa selvagem (diluição 1:531.441-1.594.323) e *Lc* BH46 (diluição 1:177.147-531.441) foram 607 e 122 vezes maior, respectivamente, quando comparado com *Lb* 2904 (Quadro 2). Assim, os monócitos infectados com as cepas de *L. chagasi* foram pelo menos 100 vezes menos efetivos em controlar a infecção do que os monócitos da cultura infectada pela *L. braziliensis*.

Cepas	Diluição
<i>Lb</i> 2904	1:2187
<i>Lc</i> Selvagem	1:531.441 – 1:1.594.323
<i>Lc</i> BH46	1:177.147 – 1:531.441

Quadro 2. Diluição do último poço positivo das culturas infectadas pelas diferentes cepas de *Leishmania*.

4.1.12 Avaliação da frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando moléculas de ativação e citocinas

Nosso próximo objetivo foi avaliar a expressão de moléculas relacionadas à ativação ou função celular por linfócitos T CD8⁺, presentes nas culturas infectadas ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*. Apesar do aparente papel de proteção das células T CD8⁺ na infecção pelo parasito *Leishmania*, essas células citotóxicas tem sido paradoxalmente associada às respostas imunopatológicas (Faria et al. 2010; Kaushal et al. 2014). Dessa forma, este estudo se torna importante na compreensão dessas células frente à infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. Através dos resultados, foi possível perceber que a percentagem de linfócitos T CD8⁺ expressando a molécula de ativação CD69, foi maior em culturas infectadas com a cepa *Lc* BH46 comparado-se com a cultura não infectada. Entretanto, não foi observada uma diferença estatística entre os linfócitos T CD8⁺ infectados com as outras duas cepas e a cultura controle (Figura 19).

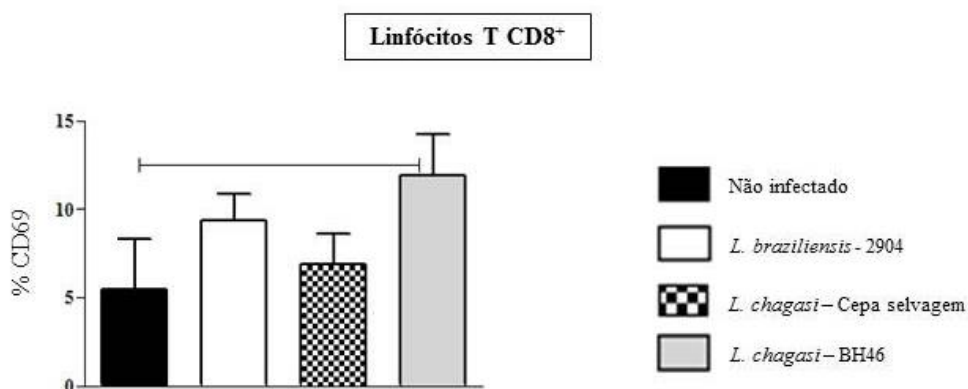


Figura 19: Frequência de linfócitos CD8⁺ expressando CD69 em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*. Resultados são expressos como média e desvio padrão (n=3). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre as diferentes condições.

Posteriormente, foi avaliada a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando a molécula co-estimuladora CTLA-4. Os resultados mostraram que os linfócitos das culturas infectadas com a cepa *Lc* BH46 tiveram uma maior frequência de CTLA-4 quando comparados com os das culturas infectadas com as outras cepas e a cultura não infectada (Figura 20).

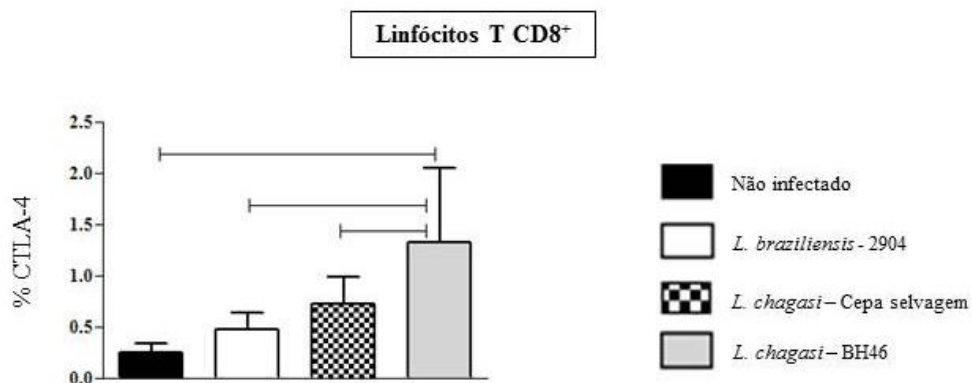


Figura 20: Frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CTLA-4 em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*. Resultado são expressos como média e desvio padrão (n=7). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre as diferentes condições.

Em seguida, foi analisada a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando citocinas importantes na resposta imune na leishmaniose.

Quando foi analisada a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando a citocina TNF- α , de maneira interessante, foi possível perceber que não houve diferença nos linfócitos provenientes de culturas infectadas ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*, na expressão de TNF- α (Figura 21).

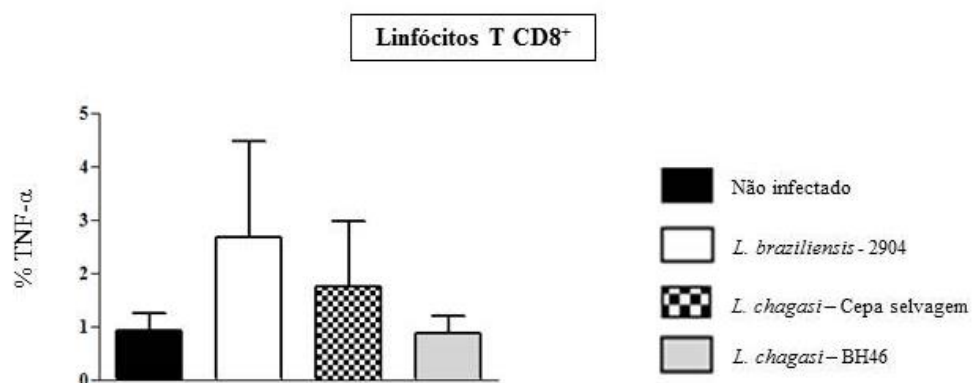


Figura 21: Frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando TNF- α em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*. Resultados são expressos como média e desvio padrão (n=5). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre as diferentes condições.

Em seguida, foi analisada a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando IFN- γ em cultura infectada ou não com diferentes cepas de *Leishmania*. Através dos resultados foi observado que os linfócitos infectados com a cepa *L. braziliensis* 2904 tiveram uma maior expressão dessa citocina inflamatória IFN- γ comparando-se com a cultura controle não infectada. Além disso, essa maior expressão foi observada também quando comparada com as duas outras cepas de *L. chagasi* (Figura 22).

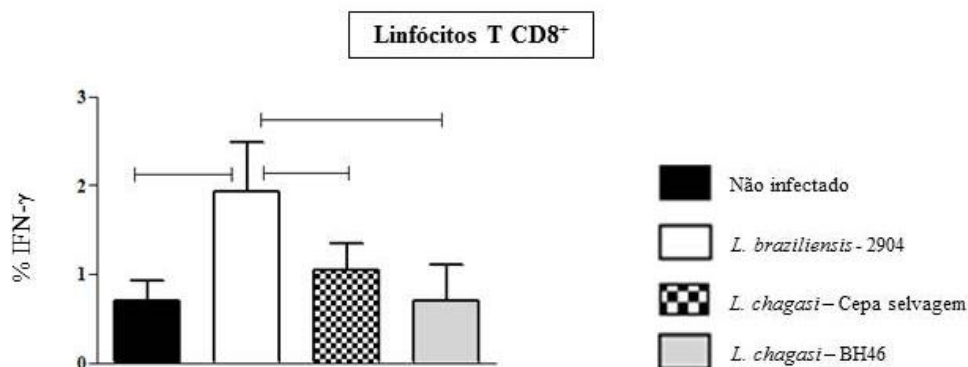


Figura 22: Frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando IFN- γ em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*. Resultados são expressos como média e desvio padrão (n=7). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

Quando foi avaliada a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando IL-17, os resultados mostraram que os linfócitos T CD8⁺ provenientes de cultura infectada com a cepa *Lb* 2904 tiveram uma maior expressão da citocina IL-17 quando comparados com os da cultura controle e com de culturas infectadas com as outras cepas de *Leishmania*. Além disso, os linfócitos T CD8⁺ provenientes de culturas infectadas com as cepas de *L. chagasi* apresentaram menor expressão de IL-17 comparando-se com os linfócitos T CD8⁺ provenientes da cultura não infectada (Figura 23).

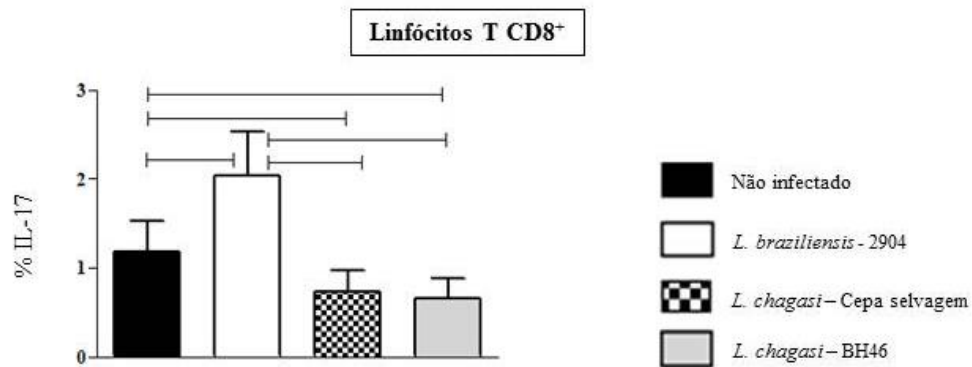


Figura 23: Frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando IL-17 em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*. Resultado são expressos como média e desvio padrão (n=7). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

Na análise da frequência dos linfócitos CD8⁺ expressando IL-10, foi possível perceber que não houve diferença estatisticamente significativa entre os linfócitos T CD8⁺ provenientes de culturas infectadas com as três cepas de *Leishmania* expressando IL-10. Entretanto, linfócitos provenientes de todas as culturas infectadas tiveram uma maior expressão de IL-10 quando comparados com os linfócitos da cultura não infectada (Figura 24).

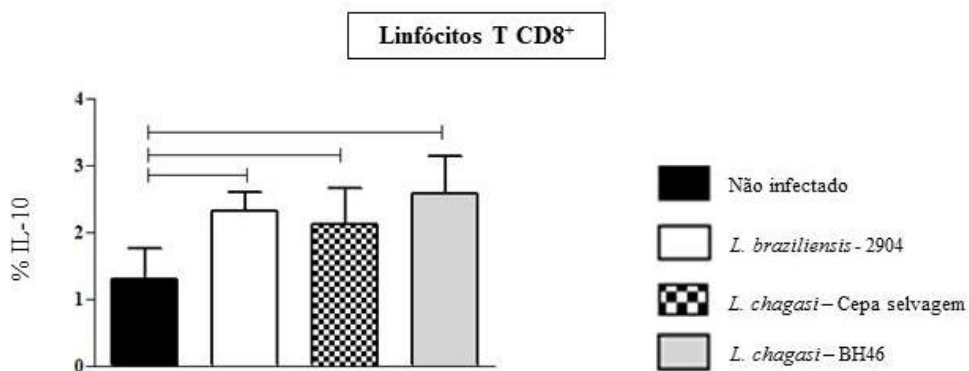


Figura 24: Frequência de linfócitos CD8⁺ expressando IL-10 em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*. Resultados são expressos como média e desvio padrão (n=7). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

Posteriormente, foi analisada a expressão da molécula citotóxica granzima A pelos linfócitos T CD8⁺. Através dos resultados foi observado que os linfócitos provenientes de culturas infectadas com a cepa *Lb* 2904 tiveram uma maior expressão de Granzima A em relação aos linfócitos provenientes de culturas infectadas com a cepa *Lc* BH6 ou de cultura não infectada (Figura 25).

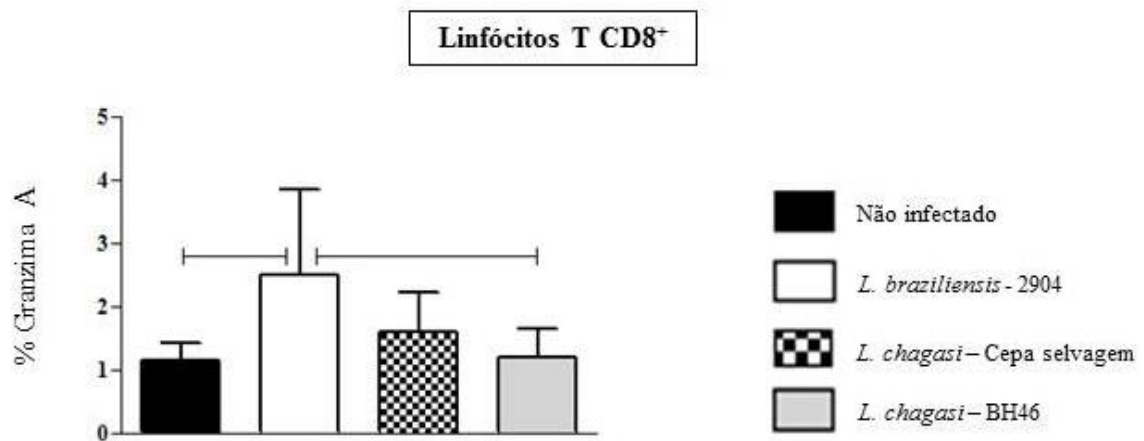


Figura 25: Frequência de linfócitos CD8⁺ expressando Granzima A em cultura infectada ou não com as diferentes cepas de *Leishmania*. Resultados são expressos como média e desvio padrão (n=7). A barra horizontal indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

4.2 Resultados referentes à 2ª parte dos objetivos

4.2.1 Expressão de pSTATs na população de linfócito total em cultura não estimulada e estimulada com SLA

Usando a citometria de fluxo para mensurar a intensidade média de fluorescência (IMF) das pSTATs específicas na população de linfócitos, foram avaliadas as pSTATs que são ativadas em resposta a citocinas inflamatórias IFN- γ (pSTAT-1), IL-12 (pSTAT-4), IL-2 (pSTAT-5), TNF- α (pNFkB) e outras ativadas por citocinas anti-inflamatórias IL-10 (pSTAT-3) e IL-4 (pSTAT-6). Neste estudo, foi avaliado o perfil da intensidade de expressão das pSTATs em linfócitos em culturas estimuladas ou não com SLA em indivíduos não infectados (NI) e pacientes com leishmaniose cutânea ativa (LC).

Os resultados mostraram uma maior expressão de pNFkB pelos linfócitos de pacientes com LC estimulados ou não SLA comparados com os linfócitos de indivíduos não infectados (Figura 26A). Quando foi analisada a intensidade de expressão da pSTAT-1, foi observado que os linfócitos que estavam em cultura com SLA apresentaram uma maior expressão dessa proteína quando comparados com os da cultura não estimulada, tanto no grupo de pacientes como nos indivíduos não infectados (Figura 26B). A análise desses dois fatores de transcrição mostrou um perfil inflamatório aumentado em pacientes com leishmaniose cutânea. A intensidade de expressão de pSTAT-3 encontrou-se diminuída em linfócitos de pacientes com LC quando comparada com os dos indivíduos não infectados (Figura 26C), ao passo que a intensidade de expressão de pSTAT-4 mostrou-se aumentada em linfócitos de pacientes LC em relação aos indivíduos não infectados na cultura não estimulada. Comparando-se culturas estimuladas ou não de células de indivíduos não infectados, houve uma maior expressão de pSTAT-4 após estímulo com SLA (Figura 26D). Ao se analisar a intensidade de expressão da pSTAT-5, foi observada uma maior expressão em linfócitos de pacientes com LC quando comparado com indivíduos NI em cultura estimulada ou não com SLA (Figura 26E). Entretanto, quando comparando-se somente entre os pacientes com LC estimulados ou não com SLA, foi observada uma maior expressão de pSTAT-5 na cultura estimulada (Figura 26E). A intensidade de expressão de pSTAT-6 mostrou-se aumentada em linfócitos de pacientes com LC comparando-se com indivíduos NI em cultura estimulada ou não com SLA. Além disso, foi observada uma

maior expressão de pSTAT-6 em células de indivíduos não infectados quando estimuladas com SLA (Figura 26F).

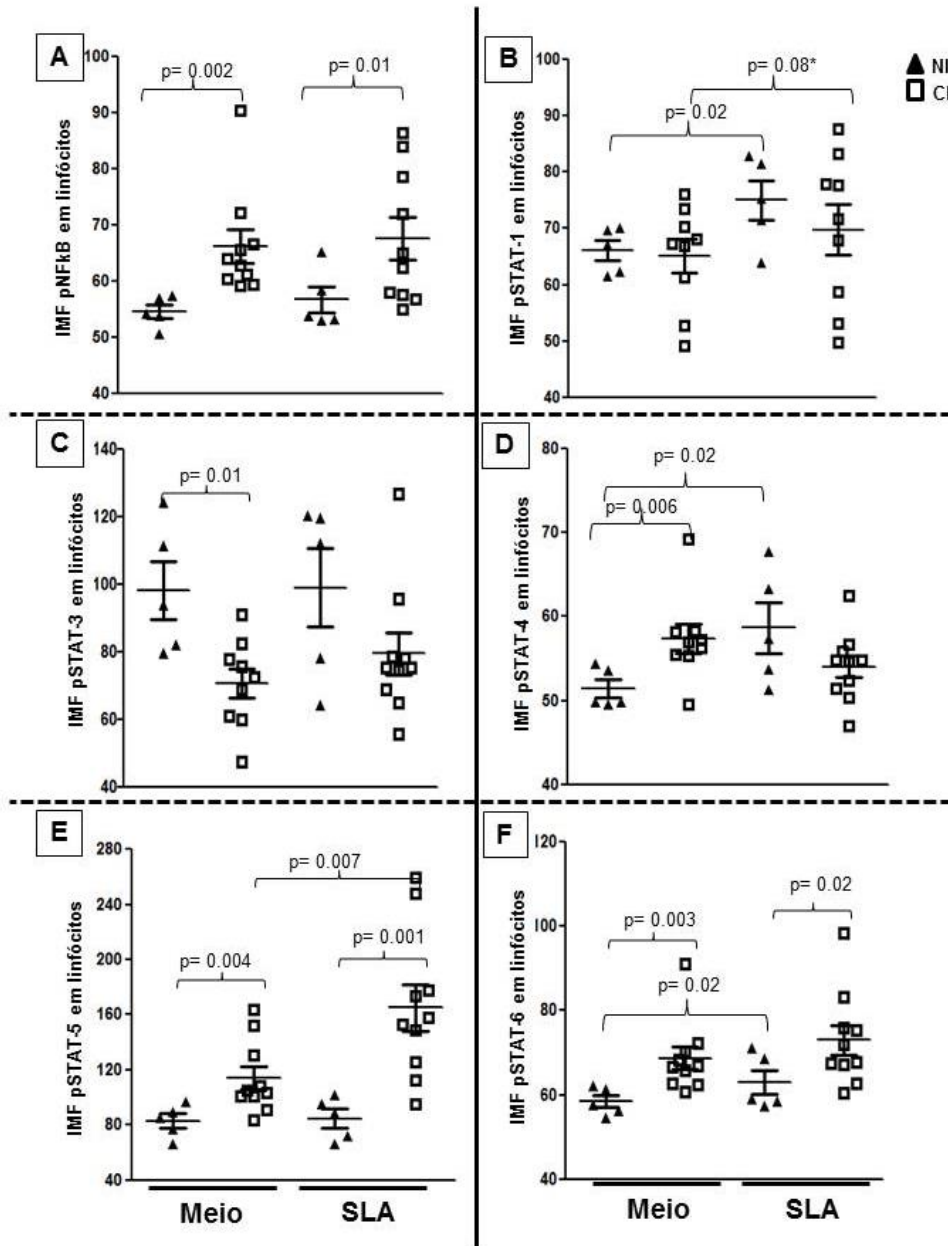


Figura 26: Intensidade média de fluorescência de pSTATs na população de linfócitos totais. A intensidade média de fluorescência (IMF) de pSTATs foi avaliada em linfócitos de indivíduos não infectados (NI) (n=5) e pacientes com leishmaniose cutânea (LC) (n=10) em cultura não estimulada (meio) e estimulada com SLA. Intensidade de expressão de A) pNFkB, B) pSTAT-1, C) pSTAT-3, D) pSTAT-4, E) pSTAT-5 e F) pSTAT-6. Barras representam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as condições. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student.

4.2.2 Análise das pSTATs nas subpopulações de linfócitos virgens e de memória em cultura não estimulada ou estimulada com SLA

Para melhor compreender qual a subpopulação de linfócito é responsável pela expressão das pSTATs, os linfócitos foram separados em duas subpopulações, CD45RA⁻ (linfócitos virgens) e CD45RA⁺ (linfócitos efetores/memória). Posteriormente, foi analisada a frequência das subpopulações de linfócitos estimulados ou não com SLA expressando as pSTATs. Para isso, nós analisamos duas pSTATs envolvidas na resposta inflamatória e anti-inflamatória, sendo representadas pela pSTAT-5 e pSTAT-3, respectivamente.

Os nossos resultados mostraram, na cultura não estimulada, um aumento na expressão da pSTAT-3 na população de linfócitos virgens de indivíduos NI quando comparado com pacientes LC (Figura 27A). Comparando-se a expressão entre as duas subpopulações de linfócitos, foi observado que a pSTAT-3 foi mais expressa em linfócitos CD45RA⁺ de indivíduos NI quando comparados com a população CD45RA⁻. Entretanto, não houve diferença estatística na expressão da pSTAT-3 entre essas duas populações de linfócitos em pacientes LC (Figura 27A). Quando foi investigada a frequência da expressão da pSTAT-3 pelos linfócitos experientes estimulados com SLA e, de maneira interessante, existiu uma diminuição na percentagem dos linfócitos de memória/experientes expressando pSTAT-3 dos pacientes LC em relação aos indivíduos não infectados (Figura 27B). Então, os nossos resultados mostraram uma redução da pSTAT-3 em linfócitos de memória/experientes quando estimulados com SLA em pacientes LC.

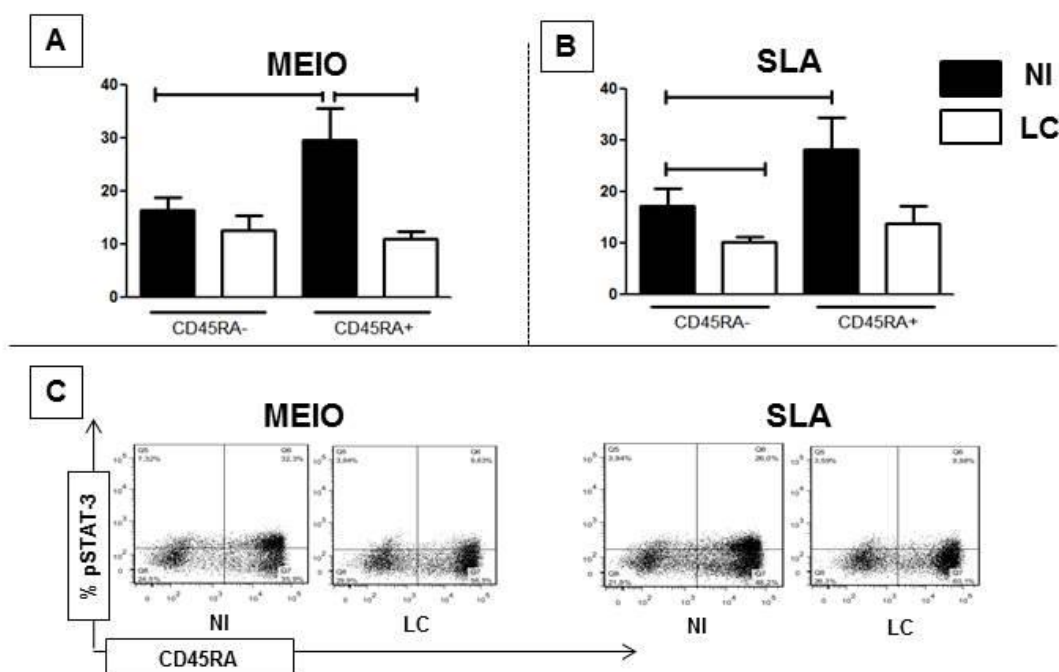


Figura 27: Avaliação da frequência de linfócitos expressando pSTAT-3 em indivíduos não infectados e pacientes com LC submetidos a cultura não estimulada e SLA. Frequência de linfócitos CD45RA⁻/CD45RA⁺ expressando pSTAT-3 A) em cultura não estimulada e B) estimulada com SLA em linfócitos de indivíduos não infectados e pacientes com leishmaniose cutânea. C) Gráfico de dispersão puntual mostrando a análise pSTAT-3 versus CD45RA. A barra representa diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições. Resultados são expressos como média e desvio padrão. Indivíduos não infectados (NI) (n=5) e pacientes com leishmaniose cutânea (LC) (n=10).

Posteriormente, foi analisada a percentagem dos linfócitos expressando a pSTAT-5 e foi observado um aumento em sua expressão pelos linfócitos virgens em pacientes LC comparado com indivíduos NI na cultura não estimulada (Figura 28A). Depois do estímulo com SLA, houve uma maior frequência de pSTAT-5 em pacientes LC em ambas as subpopulações de linfócitos comparado com os indivíduos NI exposto ao mesmo estímulo (Figura 28B). Dessa forma, os nossos resultados mostraram uma maior expressão da pSTAT-5 pelos linfócitos de memória quando estimulados com SLA nos pacientes com LC.

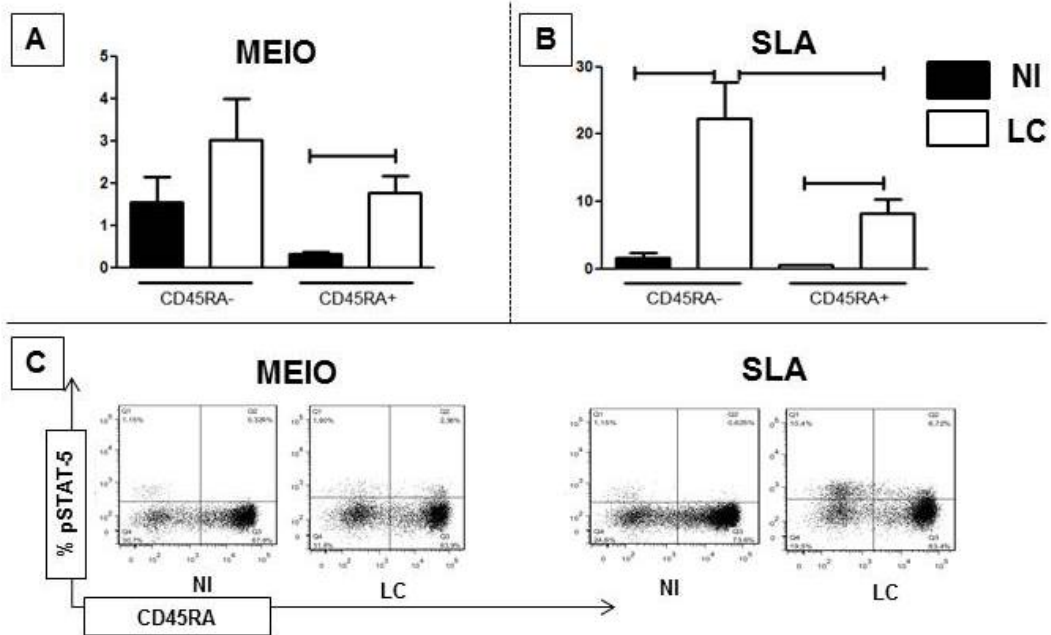


Figura 28: Avaliação da frequência de linfócitos expressando pSTAT-5 em indivíduos não infectados e pacientes com LC submetidos a cultura meio e SLA. Frequência de linfócitos CD45RA⁻/CD45RA⁺ expressando pSTAT-5 A) em cultura não estimulada e B) estimulada com SLA em linfócitos de indivíduos não infectados e pacientes com leishmaniose cutânea. C) Gráfico de dispersão puntual mostrando a análise pSTAT-5 versus CD45RA. A barra representa diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes condições. Resultado são expressos como média e desvio padrão. Indivíduos não infectados (NI) (n=5) e pacientes com leishmaniose cutânea (LC) (n=10)

Subsequentemente, foram correlacionados os dados clínicos dos pacientes com a expressão das pSTATs 3 e 5. Assim, foi observada uma correlação positiva entre o tamanho da área do teste de Montenegro e os linfócitos de memória expressando pSTAT-5 na cultura não estimulada (Figura 29)

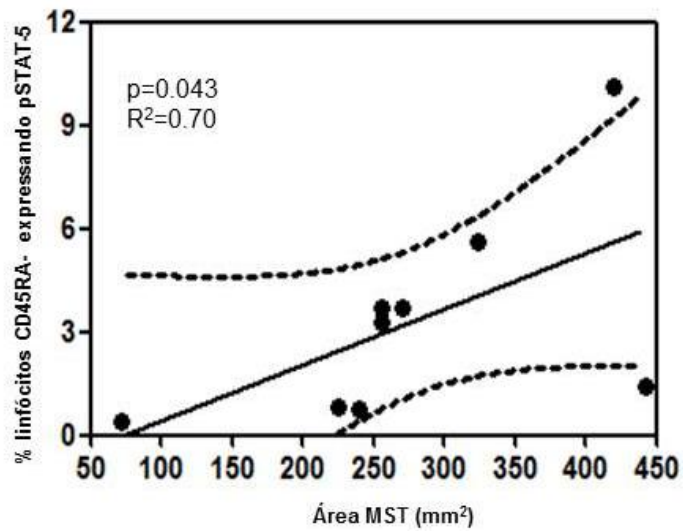


Figura 29: A área de reação do teste de Montenegro está correlacionada com a frequência de linfócitos expressando pSTATs. Correlação positiva entre a frequência de linfócitos CD45RA- expressando pSTAT-5 e o tamanho da área do teste de Montenegro (MST, mm²) em pacientes com leishmaniose cutânea (n=9). Resultado estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) e R^2 são indicadas no gráfico.

5. DISCUSSÃO

As leishmanioses, no Brasil, vêm se destacando como um sério problema de saúde pública devido, principalmente, ao intenso crescimento do processo de urbanização da doença (Who 2010). Além de fatores ambientais, as progressões clínicas das leishmanioses dependem de outros fatores como genética e condições nutricionais do hospedeiro, características dos vetores e principalmente, das espécies do parasito (Rogers et al. 2002; Goto & Lindoso 2010). No hospedeiro vertebrado, os parasitos do gênero *Leishmania* são patógenos intracelulares que infectam células fagocitárias, principalmente macrófagos, que é considerada a célula mais importante por abrigar o parasito durante a infecção (Naderer, 2008). A ativação dos macrófagos é responsável pela morte intracelular do parasito, associada principalmente à expressão de citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α e óxido nítrico (Srivastava et al. 2012).

Este trabalho propôs investigar se há uma infecção diferencial em monócitos infectados com diferentes cepas de *Leishmania* e se essas diferentes cepas induzem expressão diferencial de moléculas de superfície associadas à ativação celular e citocinas. Nossa hipótese foi que existe diferença na resposta imune induzida pelas diferentes cepas. Isto poderia explicar uma distinta resposta imune e, conseqüentemente, as diferentes formas clínicas observadas na infecção humana com *L. braziliensis* (forma tegumentar) e *L. chagasi* (forma visceral). Para isto, primeiramente, avaliamos a frequência de monócitos infectados e a sua relação na subpopulação de monócitos baseado na expressão de CD14. A infecciosidade das cepas foi caracterizada utilizando-se promastigotas marcadas com CFSE e foi analisada a porcentagem de monócitos infectados, baseada na expressão da fluorescência da *Leishmania*-CFSE⁺ em contato com os monócitos. Alguns trabalhos tem mostrado que a interação *Leishmania*-macrófago e proliferação de promastigotas podem ser mensuradas quando os parasitos são corados com CFSE e analisados através da citometria de fluxo assim como analisamos em nosso trabalho (Gonçalves et al. 2005; Messaritakis et al. 2010). Embora tenha existido uma variação da intensidade de CFSE entre monócitos infectados com as cepas, a porcentagem de monócitos infectados foi equivalente entre as cepas, após 4 horas de infecção (Figura 7A). Observamos também uma pequena diferença após 16 horas marcada pela maior infecção em monócitos infectados por *L. braziliensis* (Figura

7B). De maneira interessante, o aparente aumento na intensidade de infecção pela *L. braziliensis* foi devido a uma inerente intensidade aumentada da marcação de CFSE quando comparada às cepas de *L. chagasi* (Figura 6A) e não por uma maior internalização do parasito. Assim, a porcentagem de monócitos infectados foi equivalente entre as cepas e a diferença encontrada na intensidade de infecção, sendo relacionada à marcação do próprio parasito, não explica as diferenças vistas na ativação, perfil de citocinas e controle de infecção.

Quando foi avaliada a capacidade funcional dos monócitos em controlar a infecção pelas cepas de *Leishmania*, foi observado que os monócitos infectados com *L. chagasi* foram 100 vezes menos eficaz em controlar a infecção pela *L. chagasi* do que as células infectadas com *L. braziliensis* (Quadro 2). Possivelmente, esse resultado justificaria a menor ativação e a menor expressão de citocinas inflamatórias que foram encontrados nos monócitos infectados com as cepas de *L. chagasi* comparado com os monócitos infectados com *L. braziliensis* em nossos resultados. Através de infecção *in vivo* em modelos experimentais, Moreira et al., avaliaram a mortalidade e o parasitismo em hamsters infectados com duas diferentes cepas de *L. chagasi*: uma cepa referência da OMS, e outra classificada como cepa selvagem. Foi observado um intenso parasitismo e uma alta mortalidade em hamsters infectados com a cepa selvagem, demonstrando que essa cepa parece ser mais virulenta (Moreira et al. 2012). Além disso, tem sido visto que camundongos infectados com diferentes isolados do complexo *L. braziliensis* tem uma capacidade diferente de desenvolver lesões (Pereira et al. 2009). A variabilidade genética dos parasitos permite uma capacidade diferente de infectar os macrófagos e também de induzir de maneira diferencial uma cascata de sinalização nessas células fagocíticas (Kébai et al. 2001; Eroglu et al. 2015; Schriefer et al. 2004; Batista et al. 2012). Consequentemente, essa ampla heterogeneidade pode gerar uma variação no curso clínico da infecção (Kébai et al. 2001; Schriefer et al. 2004).

Estudos tem demonstrado que macrófagos/monócitos humanos apresentam heterogeneidade fenotípica e funcional após ativação (Podinovskaia & Descoteaux 2015). Quando foram avaliados os efeitos da infecção na expressão de CD14 pelos monócitos infectados, foi encontrado que a infecção por *L. braziliensis* levou a uma regulação negativa de CD14 e uma consequente maior frequência de CD14⁺ em monócitos infectados quando comparado com os monócitos infectados pelas cepas de *L. chagasi* ou cultura controle (Figura 8). Esta diminuição da expressão de CD14 após a infecção foi vista com 4 horas de cultura (Figura 8A) e potencializada após 16 horas

(Figura 8B). Então, apesar desta regulação negativa de CD14, os monócitos encontram-se ativados, como previamente mostrado (Souza et al. 2004). Em nosso trabalho, nós avaliamos a expressão das moléculas de superfície associadas com a ativação nas células infectadas CD14⁺ e CD14⁻ com os diferentes isolados e demonstramos que houve uma ativação em ambas as subpopulações de monócitos. No entanto, a população de monócitos CD14⁺ encontrava-se mais ativada, considerando-se os parâmetros aqui analisados. Possivelmente, a diminuição de CD14 está relacionada com um processo de ativação e clivagem do receptor. Entretanto, a permanência de CD14 na superfície dos monócitos, poderia potencializar a ativação dessas células através da interação com outros receptores presentes em sua superfície. Dessa forma, os monócitos CD14⁺ poderiam estar mais ativos quando comparado com os monócitos CD14⁻. Corroborando com o estudo de Souza et al, no qual demonstraram que monócitos CD14⁻ e CD14⁺ de pacientes chagásicos são funcionalmente diferentes (Souza et al. 2004).

Posteriormente, procuramos saber se após a infecção nos monócitos pelas diferentes cepas de *Leishmania* estudadas havia diferença na ativação celular. Dessa forma, foi analisada a expressão das moléculas de ativação TLR2, TLR9, HLA-DR e as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86. Os TLRs são responsáveis pelo reconhecimento de antígenos específicos de patógenos, e podem alterar a expressão de citocinas inflamatórias (Tuon et al. 2008). Trabalhos têm mostrado que TLR2, TLR4 e TLR9 são os principais receptores envolvidos no reconhecimento das moléculas de *Leishmania* (Tuon et al. 2008; Vieira et al. 2013; Srivastava et al. 2013; Murray et al. 2013). Nós observamos que os monócitos infectados com a cepa *Lb* 2904 apresentaram uma maior expressão de TLR2 e TLR9 quando comparados com os monócitos infectados com as outras cepas e o controle (Figuras 9 e 10). De maneira interessante, a cepa *Lb* 2904 que induziu uma maior infecção em monócitos, também levou a uma maior expressão de TLR2. Isso pode ser explicado com base no trabalho de Becker, mostrando que LPG de *L. major* pode ser reconhecido por TLR2 em células NK, e pode desencadear a sua ativação e levar um aumento nos níveis de TLR2 em sua superfície (Becker et al. 2003). LPG purificada de *L. major* mostrou ser o principal agonista de TLR2, participando no reconhecimento de *Leishmania* e na ativação de uma via importante no controle da infecção (de Veer et al. 2003).

Poucos estudos têm avaliado a expressão e o papel de TLR na leishmaniose visceral. O aumento da expressão de TLR2 na infecção de monócitos por *L. chagasi*, comparando-se com a cultura não infectada, observado em nossos resultados, indica que

o aumento de sua expressão reflete um processo de ativação celular (Cezário et al. 2011; Gatto et al. 2015). O TLR9 é essencial para o controle da lesão e replicação do parasito. Camundongos deficientes para TLR9 apresentam uma lesão maior e uma alta carga parasitária quando infectados com *L. braziliensis* (Weinkopff et al. 2013). Os nossos resultados mostraram que os monócitos infectados pela *L. braziliensis* tiveram uma maior expressão de TLR9 e isso parece refletir na expressão de citocina inflamatória, visto que houve uma correlação positiva entre TLR9 e TNF. Além disso, nossos resultados mostraram também que os monócitos infectados pelas cepas de *L. chagasi* tiveram uma maior expressão de TLR9 quando comparados com a cultura controle. Este aumento parece ser muito importante na resposta imune, tendo sido visto que em pacientes com leishmaniose visceral, após o tratamento com Miltefosine, há um aumento da expressão de TLR4 e TLR9, gerando uma forte resposta de citocinas pró-inflamatórias que são importantes na resolução da doença (Mukherjee et al. 2012). Apesar de observarmos, em nosso trabalho, um aumento da expressão de TLR9 em monócitos infectados com as cepas de *L. chagasi* em relação ao controle, tem sido mostrado, em modelo experimental, que a interação de LPG/TLR2 pode modular a expressão de TLR9 levando susceptibilidade à infecção no hospedeiro quando estimulado com *L. major* (Srivastava et al. 2013). Provavelmente o fato de não termos observado essa modulação em nossos resultados, onde a expressão de ambos os TLR foi aumentada, esteja relacionada à infecção de monócitos por diferentes espécies de *Leishmania*, implicando em uma resposta imune diferenciada.

A expressão da molécula HLA-DR em monócitos reflete o estado de ativação dessas células. Essa molécula está envolvida na apresentação dos antígenos para as células T (Kanakoudi-Tsakalidou et al. 2001). Os resultados mostraram que os monócitos CD14⁻ e CD14⁺ apresentaram uma elevada expressão de HLA-DR quando infectados com a cepa *Lb* 2904, comparando-se com as demais cepas, demonstrando que esse isolado leva a uma maior ativação celular dos monócitos (Figura 11).

Posteriormente, foram avaliadas as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 que são expressas, principalmente, na superfície de células apresentadoras de antígeno. Elas são responsáveis pelo segundo sinal na ativação e proliferação dos linfócitos T por meio de ligação em seus receptores, CD28 e CTLA-4 (Elloso & Scott 1999). De maneira interessante, nós observamos que os monócitos infectados com a cepa selvagem de *L. chagasi* tiveram uma menor expressão de CD86 (Figura 13). Já quando avaliada a molécula CD80, observamos que em monócitos CD14⁻, a cepa *Lc* BH46

induziu a uma maior expressão dessa molécula nos monócitos comparados com as outras cepas e o controle (Figura 12). Tem sido demonstrado que CD80 recruta e se liga preferencialmente a CTLA-4 levando a uma inibição dos linfócitos, enquanto CD86 recruta preferencialmente CD28, promovendo uma ativação celular dos linfócitos (Pentcheva-Hoang et al. 2004). Com isso, observamos que a cepa *Lc* selvagem parece regular negativamente a expressão de CD86 nos monócitos infectados. Assim, a menor expressão dessa molécula pode contribuir com a diminuição da ativação de uma resposta efetiva de células T. Corroborando com o nosso achado, monócito de cães infectados com *L. infantum* mostraram uma redução na expressão das moléculas co-estimuladoras, principalmente CD86, prejudicando assim a ativação das células T (Diaz et al. 2012).

Uma resposta imune protetora na leishmaniose tem sido associada com uma resposta celular eficiente resultando na produção de citocinas como IL-12, IFN- γ e TNF- α que levam a ativação de macrófagos e, conseqüentemente, controlam o parasito (Srivastava et al. 2012). Entretanto, na leishmaniose tegumentar existe uma associação do aumento da expressão de IFN- γ e do tamanho maior da lesão, indicando que uma forte resposta inflamatória é importante no começo da doença, mas sua ação prolongada leva a uma destruição celular e tecidual (Antonelli et al. 2005). Por outro lado, na leishmaniose visceral é visto uma resposta imune moduladora, marcada principalmente pela produção de IL-10 (Bacellar et al. 2000). Em nossos resultados foi possível perceber uma expressão aumentada de IL-12/IL23-p40 pelos monócitos infectados em relação ao controle (Figura 14). A IL-12p40 é a forma monomérica de IL-12 e IL-23, ela tem sido encontrada em altas concentrações inicialmente em cultura estimulada com LPS. Ao contrário, a sua forma heterodimérica e biologicamente funcional IL-12p70 é encontrada em menores concentrações (Oliveira et al. 2003). A IL-12 está envolvida, principalmente, na diferenciação dos linfócitos T em uma resposta mais proinflamatória. Os nossos resultados mostraram que monócitos infectados pela *L. braziliensis* apresentaram uma maior expressão de TNF- α em relação aos monócitos infectados pelas outras cepas de *L. chagasi* na subpopulação CD14⁻ (Figura 15). Não houve diferença na expressão da citocina moduladora IL10 em monócitos CD14⁻ infectados. No entanto, percebeu-se uma tendência no aumento da expressão de IL-10 em monócitos CD14⁺ infectados com a cepa *Lc* selvagem (Figura 16). Quando analisamos a razão TNF- α /IL-10, percebemos que monócitos infectados com a cepa dermatrópica (*L. braziliensis*), demonstrou ser mais inflamatório, pois teve uma maior razão inflamatória

quando comparados com monócitos infectados com as cepas viscerotrópicas (*L. chagasi*) (Figura 17).

Posteriormente, verificamos se havia correlação entre a expressão de citocinas e TLRs. Foi observado, em nossos resultados, que na subpopulação de monócitos CD14⁻ teve uma correlação positiva entre TLR2⁺/TNF- α ⁺ e entre TLR9⁺/TNF- α ⁺, enquanto que nos monócitos CD14⁺ observamos uma correlação positiva entre TLR2⁺/TNF- α ⁺, todas essas correlações foram observadas quando os monócitos foram infectados com *L. braziliensis* (Figura 18). Uma possível explicação para isso, é que a expressão de TLR2 e TLR9 são importantes nos momentos iniciais de uma infecção pela *Leishmania* com uma produção de uma resposta imune inflamatória necessária para o controle do parasito (Cezário et al. 2011; Weinkopff et al. 2013). Observamos ainda uma correlação interessante em nossos resultados, mostrando que a cepa selvagem de *L. chagasi* apresentou correlação entre TLR2⁺/TNF- α ⁺ em monócitos CD14⁺. Já é descrito que TLR2 está envolvido principalmente na expressão de citocinas proinflamatórias como TNF- α e IL-12, mas também com a expressão da citocina moduladora IL-10 (Rojas-Bernabé et al. 2014; Gatto et al. 2015). Então, essa correlação observada entre TLR2⁺/TNF- α ⁺ nos monócitos infectados pela cepa viscerotrópica, possivelmente seria uma resposta imune inflamatória inicial importante no controle do parasito, uma vez que tem sido visto que pacientes com leishmaniose visceral há um envolvimento entre TLR2 e expressão de TNF- α (Gatto et al. 2015). No entanto, a expressão de TLR2 está associada também a níveis aumentados da citocina moduladora IL-10 (Gatto et al. 2015). Esta correlação não foi observada neste trabalho e, uma possibilidade é que essa associação aconteceria em períodos mais tardios e nosso estudo foi realizado considerando um período inicial de infecção (células de indivíduos normais infectadas *in vitro*).

Em seguida, comparamos se havia diferença na expressão das moléculas analisadas nesse estudo entre monócitos infectados pela mesma cepa nas subpopulações de monócitos CD14⁻ e CD14⁺. De maneira interessante, percebemos que houve diferença na expressão das moléculas de ativação e co-estimulação entre as subpopulações de monócitos, sendo que foi observada sempre uma menor expressão dessas moléculas em monócitos CD14⁻ comparados com monócitos CD14⁺ (Tabela 2). Então, a regulação negativa de CD14 parece se relacionar com a ativação dos monócitos. Entretanto, a permanência do co-receptor CD14 parece favorecer a contínua ativação dos monócitos e, conseqüentemente, esses monócitos tem uma maior expressão

das moléculas de ativação e co-estimulação. Dessa forma, nos nossos resultados corroboramos com o estudo de Souza et al., no qual mostra que essas duas subpopulações de monócitos são fenotipicamente distintas (Souza et al. 2004).

Em nosso trabalho foi evidenciado que as diferentes cepas de *Leishmania* podem infectar de maneira diferenciada as subpopulações de monócitos CD14⁻ e CD14⁺. Além disso, os diferentes isolados geraram alterações na resposta imune, contribuindo para a alteração na expressão das moléculas de ativação e de citocinas. Ainda, os monócitos infectados com *L. chagasi* foram menos eficazes no controle de infecção do que as células infectadas com *L. braziliensis*. Portanto, os resultados mostraram que os diferentes isolados das cepas dermatrópicas e viscerotrópicas induzem uma resposta imune diferenciada, o que pode influenciar o curso clínico das leishmanioses.

Trabalhos na literatura têm demonstrado a importante participação dos linfócitos T CD4⁺ na resposta imune em pacientes com as diferentes formas clínicas da leishmaniose (Antonelli et al. 2005). Entretanto, poucos estudos abordam a importância dos linfócitos T CD8⁺ na leishmaniose. Além disso, os estudos sobre essas células citotóxicas ainda são bastante controversos, pois existe um paradoxo no papel dos linfócitos T CD8⁺. Enquanto alguns estudos mostram que essas células são importantes na proteção, outros estudos, sugerem que esses linfócitos estão associados com funções patológicas na leishmaniose (Faria et al., 2005; Cardoso et al. 2015; Kaushal et al. 2014). Considerando-se a escassez de trabalhos relacionados ao papel de células T CD8⁺, decidimos focalizar nossos estudos nessa importante sub-população celular, avaliando as consequências da exposição de células T CD8⁺ a monócitos infectados com as diferentes cepas. Avaliamos, nestas células, a expressão de moléculas de ativação, e dois grupos de moléculas funcionais: citocinas, fundamentais na função de imunoregulação, e granzima A, relacionada à função de citotoxicidade.

Primeiramente, foram avaliadas as principais moléculas de superfície que estão relacionadas a ativação dos linfócitos T, representada pela molécula CD69, e também pela molécula inibidora de linfócitos T, CTLA-4. A ativação dos linfócitos T e células NK induzem a expressão do marcador de superfície CD69 que age como uma molécula coestimulatória para ativação e proliferação dos linfócitos T (Marzio et al. 1999). Quando foi avaliada a expressão da molécula de ativação CD69 nos linfócitos T CD8⁺, os resultados mostraram que os linfócitos T CD8⁺ em cultura de monócitos infectados

com a cepa *Lc* BH46 tiveram uma maior expressão dessa molécula comparada com a cultura controle. Não foi observada diferença entre os linfócitos T CD8⁺ expressando CD69 entre a cultura controle e a cultura infectada com as outras cepas (Figura 19). Acreditamos que em virtude do número amostral (n=3) menor para avaliar especificamente esse marcador, os números podem estar subestimados.

A molécula CTLA-4 presente principalmente em na superfície de linfócitos T, tanto em T CD4⁺ como CD8⁺. A sua função está relacionada à regulação negativa da ativação dos linfócitos T (McCoy & Le Gros 1999). Os nossos resultados mostraram que a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CTLA-4 quando infectados com a cepa *Lc* BH46 foi maior comparado com a cultura de linfócitos infectados com as outras cepas e com a cultura não infectada (Figura 20). De maneira interessante, os monócitos CD14⁺ infectados por essa mesma cepa *Lc* BH46, apresentaram uma maior intensidade de expressão de CD80. Dessa forma, esses resultados parecem corroborar com o estudo de Pentcheva-Hoang et al., que mostra que CD80 recruta e se liga preferencialmente a CTLA-4 (Pentcheva-Hoang et al. 2004). Além disso, no estudo de Murphy et al., foi evidenciado que o bloqueio de CTLA-4 na infecção experimental com *L. donovani* aumenta a resistência do hospedeiro ao patógeno (Murphy et al. 1998). Apesar de ainda não ter sido evidenciado a relação da inibição da resposta celular pelo CTLA-4 em linfócitos T CD8⁺ na LV, Gomes et al., mostraram que a ativação de CTLA-4 em linfócitos T CD4⁺ está envolvido na replicação do parasito em modelo experimental (Gomes et al. 2000). Este é um achado importante pois pode estar associado à reduzida resposta celular observada em pacientes com leishmaniose visceral.

Uma grande importância dos linfócitos T CD8⁺, é a expressão de citocinas que contribuem para a manutenção da resposta imune e ativação dos monócitos para a eliminação do parasito. Assim, em nosso estudo quando foi avaliada a expressão das citocinas inflamatória IFN- γ e TNF- α , os resultados mostraram que a cultura de linfócitos expostos a monócitos infectados com a cepa *Lb* 2904 apresentou uma maior expressão de IFN- γ quando comparada com as de linfócitos expostos a monócitos infectados com as outras cepas e também com a cultura não infectada (Figura 22). Entretanto, quando avaliada a expressão da citocina TNF- α pelos linfócitos T CD8⁺, não foi observada diferença estatística entre os linfócitos expostos a monócitos infectados com as diferentes cepas e a cultura controle (Figura 21). Tem sido observado um aumento da expressão de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ em indivíduos subclínicos e

pacientes curados, tanto com leishmaniose tegumentar quanto visceral, aumentando assim, a resistência desses indivíduos contra a doença. Esse aumento de IFN- γ é importante para que ocorra uma manutenção de uma resposta inflamatória e, conseqüentemente, a proteção à infecção pela *Leishmania* (Cardoso et al. 2015; Kaushal et al. 2014). Rostami et al, mostraram que o aumento da expressão dessas citocinas pelos linfócitos T CD8⁺ tem sido associado com uma imunidade protetora na infecção pela *L. major* (Rostami et al. 2010). De maneira interessante, essa maior expressão de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ em cultura infectada pela *L. braziliensis*, corrobora com o resultado de uma maior ativação dos monócitos infectados pela mesma espécie. Assim, é possível observar novamente o caráter mais inflamatório caracterizado por essa espécie, responsável pela LC.

Uma outra citocina que tem sido bastante estudada é a IL-17. O efeito proinflamatório de IL-17 ocorre com o resultado da ativação de iNOS e estimulação de fibroblastos, neutrófilos, macrófagos e células epiteliais a produzir mediadores proinflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- α , metaloproteinases e quimiocinas (Kolls & Linde 2004). Entretanto, a participação dessa citocina não é tão bem compreendida na leishmaniose. Os resultados mostraram que, os linfócitos T CD8⁺ quando expostos a monócitos infectados com a cepa *Lb* 2904 de *L. braziliensis* tiveram uma maior expressão de IL-17 quando comparados com os da cultura infectada ou não com as outras cepas (Figura 23). De maneira semelhante com os nossos resultados, tem sido observado na leishmaniose cutânea, uma maior expressão de IL-17. Acredita-se que a presença da IL-17 possa estar envolvida na patogênese, pois tem sido encontrada uma associação entre a IL-17 e a intensidade do infiltrado inflamatório (Bacellar et al. 2010). No entanto, na LV causada pela *L. infantum*, a IL-17 demonstra ter um papel protetor. Essa citocina age sinergicamente com IFN- γ e potencializa a atividade leishmanicida dos macrófagos infectados através da produção de NO (Sales et al. 2015). De maneira interessante, nossos resultados mostraram que a IL-17 encontra-se diminuída na cultura de linfócitos infectados com as cepas de *L. chagasi*, assim, a diminuição dessa proteína parece refletir a discreta resposta inflamatória que é encontrada na LV. Posteriormente, foi analisada a expressão da citocina reguladora IL-10 pelos linfócitos T CD8⁺ e foi observado que não houve diferença na expressão dessa citocina entre os linfócitos infectados pelas diferentes cepas (Figura 24). Este resultado parece controverso, uma vez, que já foi demonstrado na leishmaniose visceral a importância da produção de IL-

10 pelos linfócitos T CD8⁺ em pacientes com LV (Peruhype-Magalhães et al. 2006). No entanto, uma possível explicação para o nosso achado, é que o aumento de IL-10 seria encontrado em um período mais tardio da infecção.

Granzima A e B, são proteinases produzidas pelos linfócitos citotóxicos e que induzem morte celular por apoptose em células alvo (Mc et al. 2009). Em nosso estudo, foi avaliada a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando a molécula granzima A em cultura infectada, ou não, com as diferentes cepas de *Leishmania*. Os resultados mostraram que os linfócitos expostos a monócitos infectados com a cepa de *L. braziliensis* 2904, apresentaram uma maior expressão de granzima A quando comparados com os linfócitos expostos a monócitos infectados com a cepa *Lc* BH46 e, também, quando comparado com os linfócitos da cultura não infectada. Apesar de bastante controverso o principal papel desses linfócitos citotóxicos, Cardoso, et al., demonstraram que linfócitos T CD8⁺ de pacientes com leishmaniose cutânea apresentam uma grande produção de granzima. Entretanto, este aumento de granzima, não está somente relacionado com a morte do monócito/parasito, mas também, está contribuindo para o dano tecidual e desenvolvimento de úlceras cutânea (Faria et al. 2010; Cardoso et al., 2015). Contrariamente, em indivíduos curados para leishmaniose visceral, tem sido observada uma importante e rápida proliferação de linfócitos citotóxicos com produção de granzima. Este aumento parece ter um importante papel em uma possível reinfecção com *L. donovani*. De maneira diferente, em pacientes com leishmaniose visceral ativa, tem sido observada uma diminuição de citocinas inflamatórias e de linfócitos citotóxicos, levando o paciente a uma susceptibilidade para a doença (Kaushal et al. 2014).

Baseado nos resultados, foi possível observar que a cultura de linfócitos expostos a monócitos infectados com *L. braziliensis* levou a uma maior expressão de moléculas relacionadas com um perfil mais inflamatório. Enquanto isso, a cultura de linfócitos expostos a monócitos infectados com as cepas de *L. chagasi* apresentou uma resposta mais antiinflamatória e isso é consistente com os quadros clínicos desencadeados por essas diferentes espécies de *Leishmania*.

Os nossos resultados mostraram que houve diferença na expressão de moléculas de ativação e expressão de citocinas pelas CMSP infectadas com as diferentes espécies de *Leishmania*. Além disso, foi observado também uma diferença na

expressão de proteínas entre as cepas da mesma espécie de LV. Dessa forma, acredita-se que há alterações intraespecíficas que modulam diferentemente a resposta imune (Figura 30).

A presença de citocinas no microambiente favorece o reconhecimento e sinalização pelas fosfo-STATs e uma ativação da resposta imune pelos linfócitos. Dessa forma, nós avaliamos a importância da presença das STATs ativadas em pacientes com leishmaniose tegumentar.

Quando nós decidimos investigar a intensidade de expressão de pSTATs em linfócitos, nossos resultados mostraram que houve uma maior expressão das fosfo-STATs relacionadas a um perfil mais inflamatório como as pSTAT-1, pNFkB e pSTAT-5, ao passo que a pSTAT-3 encontrou-se diminuída em pacientes com leishmaniose cutânea.

A inflamação na leishmaniose cutânea é uma resposta fundamental envolvida no sucesso de eliminação do patógeno. No entanto, a exacerbação da inflamação eventualmente causa dano tecidual (Antonelli et al. 2005). A IL-10 participa do mecanismo homeostático que controla a extensão e duração da inflamação (Bacellar & Carvalho 2005). Trabalhos na literatura tem investigado o papel da relação IL-10 e pSTAT-3 no macrófago e tem sido demonstrado que a ativação dessa via é capaz de bloquear a ação de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (Murray 2006).

Em linfócitos T CD4⁺ purificados e cultivados *in vitro* com as citocinas IFN- γ e IL-4 há um aumento na expressão da pSTAT-3 em linfócitos T em diferenciação (Anderson et al. 2003). Este achado corrobora com os nossos resultados que mostraram que pSTAT-3 está aumentada em linfócitos de indivíduos não infectados em cultura não estimulada, especialmente, na população de linfócitos virgens. Este resultado sugere que pSTAT-3 pode participar em uma possível regulação da resposta imune. Entretanto, os linfócitos de pacientes com LC tiveram uma diminuição desta pSTAT, principalmente, quando estimulada com SLA, o que poderia indicar que esta regulação foi perdida na infecção.

Em nossos resultados, foi observado que os linfócitos de pacientes com LC quando estimulados com SLA tiveram uma maior frequência de pSTAT-5, especialmente, na população de linfócitos experientes. A pSTAT-5 está envolvida na

via de IL-2/IL-2R. IL-2 é o principal fator de crescimento para células T ativadas e desempenha um função importante na expansão e diferenciação dos linfócitos (Heltemes-Harris et al. 2011). Possivelmente, os linfócitos dos pacientes com LC que foram primados na infecção, quando estimulados com o antígeno de *Leishmania* respondem à citocina que é responsável pela expansão dos linfócitos, isto é visto pela maior expressão da pSTAT-5 na população de linfócitos experientes.

A análise de correlação ente os parâmetros clínicos e a percentagem de linfócitos expressando as pSTATs mostrou uma associação positiva entre linfócitos experientes expressando pSTAT-5 com o tamanho da reação ao teste de Montenegro (MST). Isto pode sugerir que a presença da pSTAT-5 está envolvida na proliferação celular, gerando uma resposta mais intensa ao teste de Montenegro, levando uma ativação das células efectoras/memória. Antonelli et al., observaram uma correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD4⁺ recentemente ativados e o tamanho da reação ao MST. Acredita-se que a associação de linfócitos T CD4⁺ pode ser importante na indução de uma resposta inflamatória (Antonelli et al. 2005). A manutenção de uma resposta imune antígeno-específico, ou seja, de uma resposta de memória, é importante para resistência a reinfecção. Carvalho, 2013, avaliou a resposta imune em pacientes tratados e curados para leishmaniose cutânea e observou que os indivíduos não responderam *in vitro* ao antígeno de *Leishmania*. Entretanto, esses mesmos indivíduos responderam *in vivo* após a administração do MST. Isto demonstra que a resposta a este antígeno é importante para avaliar a imunidade depois da cura e que há uma resposta de memória persistente nestes indivíduos (Carvalho et al. 2013). Possivelmente, os linfócitos T antígeno específicos de memória desses indivíduos foram recrutados para a pele ou linfonodos, o que explicaria a baixa resposta observada *in vitro*.

Em resumo, nossos resultados indicam um papel ativo de pSTATs em um ambiente inflamatório com um expressão aumentada de fosfo-STAT relacionada a inflamação (pSTAT-5) por linfócitos experientes/memória, especialmente em pacientes com LC estimulados com SLA. Ao passo que houve uma diminuição na fosfo-STAT relacionada com um ambiente antiinflamatório induzido por IL-10 (pSTAT-3). Estes dados são consistentes com o ambiente inflamatório observado durante a doença (Figura 31).

6. RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS

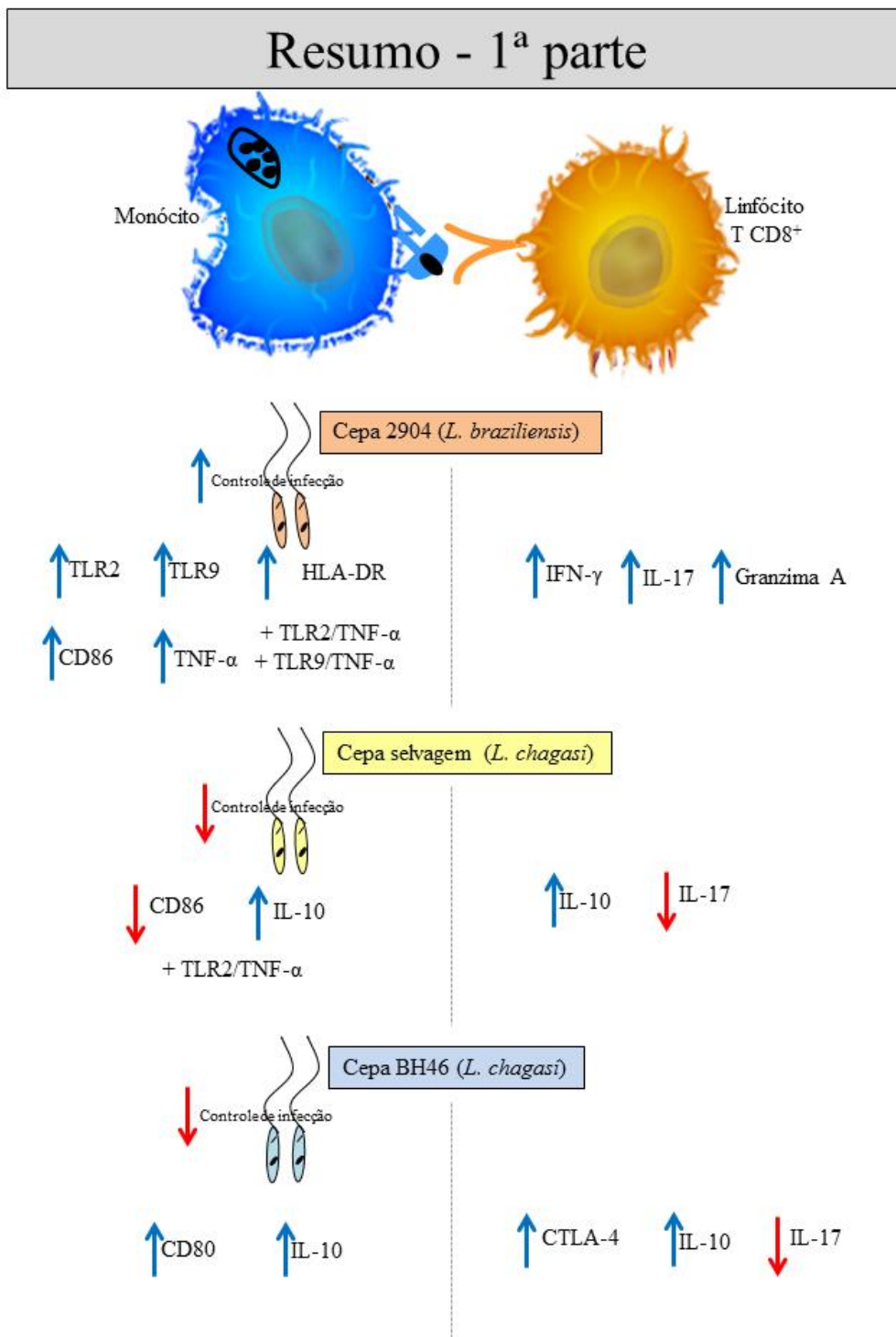


Figura 30: Esquema representativo dos resultados encontrados em monócitos e linfócitos infectados pelas diferentes cepas de *Leishmania*.

Resumo - 2ª parte

Pacientes com leishmaniose cutânea

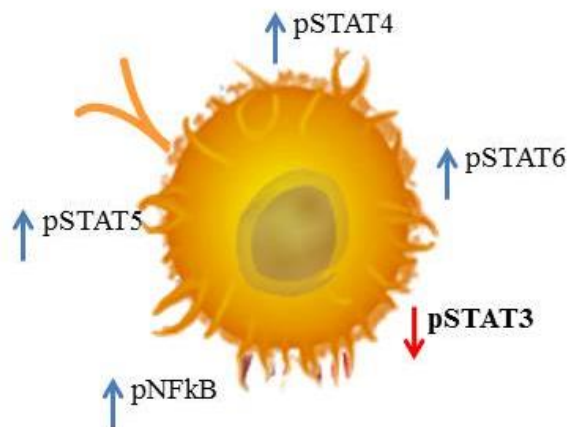


Figura 31: Esquema representativo dos resultados encontrados em linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea.

7. CONCLUSÃO

Conclusão da 1ª parte

Através dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que as células mononucleares do sangue periférico infectadas por diferentes cepas de *Leishmania* tiveram uma expressão diferencial de moléculas de ativação e expressão de citocinas. A cultura infectada com *L. braziliensis* apresentou um perfil mais inflamatório observado, principalmente, pela maior expressão de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-17). De maneira contrária, foi observado que as culturas infectadas pelas cepas de *L. chagasi* apresentaram um perfil mais anti-inflamatório, representado pela expressão das moléculas CD80 e CTLA-4 e pelo estabelecimento de um perfil de citocinas predominantemente antiinflamatório, dado pela redução da razão citocinas inflamatórias/IL-10. Além disso, os monócitos infectados com *L. chagasi* foram 100 vezes menos eficaz no controle de infecção do que as células infectadas com *L. braziliensis*. Assim, esses resultados são consistentes com as características observadas na infecção humana, no qual pacientes com leishmaniose tegumentar (*L. braziliensis*) apresentam um perfil mais inflamatório associado à patologia, enquanto que pacientes com a forma visceral apresentam um ambiente mais regulatório.

Conclusão da 2ª parte

Nossos resultados mostram um papel ativo de STATs em um ambiente inflamatório com um aumento da expressão de fosfo-STATs relacionadas à inflamação (STAT-5) por linfócitos “experientes”, principalmente em pacientes com leishmaniose cutânea estimulados com SLA. Além disso, houve uma diminuição na fosfo-STAT relacionada a um ambiente antiinflamatório induzida por IL-10 (STAT-3). Estes dados são compatíveis com o ambiente inflamatório observado durante a doença.

8. REFERÊNCIAS

- Abbas, a K. & Janeway, C. a, 2000. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell*, 100(1), pp.129–138.
- Anderson, P. et al., 2003. Differential activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 and STAT5 and induction of suppressors of cytokine signalling in T(h)1 and T(h)2 cells. *Int Immunol*, 15(11), pp.1309–1317. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14565929>.
- Antonelli, L.R. V et al., 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology letters*, 101(2), pp.226–230.
- De Assis, R.R. et al., 2012. Glycoconjugates in New World species of Leishmania: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(9), pp.1354–1365. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.001>.
- Bacellar, O. et al., 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine*, 12(8), pp.1228–1231.
- Bacellar, O. et al., 2010. IL-17 production in patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 200(1), pp.75–78.
- Bacellar, O. & Carvalho, E.M., 2005. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis. *Gazeta Médica da Bahia*, 75(1), pp.24–34.
- Baratta-Masini, A. et al., 2007. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Frontiers in Bioscience*, 12, pp.839–849.
- Barral, A. & Barral-netto, M., 2009. Aspectos imunológicos da leishmaniose cutânea difusa (LCD). *Gazeta Médica da Bahia*, 79, pp.35–39.
- Batista, L.F.D.S. et al., 2012. An assessment of the genetic diversity of Leishmania infantum isolates from infected dogs in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(5), pp.799–806.
- Becker, I. et al., 2003. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130(2), pp.65–74.
- Bradley, J., 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology*, 214(December), pp.149–160.
- Braga, S.L., 2011. Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia “ Caracterização biológica , bioquímica e molecular em isolados de Leishmania infantum obtidos de cães naturalmente inf.
- Brodskyn, C.I. et al., 1997. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(9), pp.4467–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379046>.
- Cardoso, T.M. et al., 2015. Protective and Pathological Functions of CD8⁺ T Cells in Leishmania braziliensis Infection. *Infection and Immunity*, 83(3), pp.898–906. Available at: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.02404-14>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25534940>.

- Carvalho, A.M. et al., 2013. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. *BMC infectious diseases*, 13(1), p.529. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/529>.
- Castellano, L.R. et al., 2009. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Human Immunology*, 70(6), pp.383–390. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.007>.
- Cezário, G.A.G. et al., 2011. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(5), pp.573–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21894379>.
- Couper, K., Blount, D. & Riley, E., 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of immunology*, 180(9), pp.5771–5777.
- Da-cruz, A.M. et al., 2002. T-Cell-Mediated Immune Responses in Patients with Cutaneous or Mucosal Leishmaniasis : Long-Term Evaluation after Therapy. *Clin Diag Lab Immunol*, 9(2), pp.251–256.
- Dias, E.S. et al., 2007. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(1), pp.49–52.
- Diaz, S. et al., 2012. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. *Veterinary Parasitology*, 189(2-4), pp.137–144.
- Dutra, W.O. et al., 2011. Immunoregulatory and Effector Activities in Human Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis: Understanding Mechanisms of Pathology. *Drug development research*, 72(6), pp.430–436. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3595558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Elloso, M.M. & Scott, P., 1999. Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(11), pp.6708–6715.
- Eroglu, F. et al., 2015. Clinical manifestations and genetic variation of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in Southern Turkey. *Experimental Parasitology*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489415001034>.
- Faria, D.R. et al., 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 73(12), pp.7853–7859.
- Faria, D.R. et al., 2010. Recruitment of CD8+ T cell expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. , 31(8), pp.432–439.
- Farias, L.H.S. et al., 2013. Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two leishmania (Viannia) braziliensis strains involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 207, pp.537–543.
- Da Fonseca Pires, S. et al., 2014. Identification of virulence factors in leishmania infantum strains by a proteomic approach. *Journal of Proteome Research*, 13(4), pp.1860–1872.
- Gatto, M. et al., 2015. The Involvement of TLR2 and TLR4 in Cytokine and Nitric Oxide Production in Visceral Leishmaniasis Patients before and after Treatment with Anti-Leishmanial Drugs. *Plos One*, 10(2), p.e0117977. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0117977>.

- Gautam, S. et al., 2014. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 209(2), pp.290–299.
- Gollob, K.J., Antonelli, L.R. V & Dutra, W.O., 2005. Insights into CD4+ memory T cells following Leishmania infection. *Trends in Parasitology*, 21(8), pp.347–350.
- Gollob, K.J., Viana, A.G. & Dutra, W.O., 2014. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. *Parasite immunology*, (October 2013), pp.367–376. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24471648>.
- Gomes, N. a. et al., 2000. TGF- Mediates CTLA-4 Suppression of Cellular Immunity in Murine Kalaazar. *The Journal of Immunology*, 164(4), pp.2001–2008. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/164/4/2001.full>.
- Gonçalves, R. et al., 2005. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of L. chagasi to canine peritoneal macrophages. *BMC infectious diseases*, 5, p.39.
- Gontijo, B. & De Carvalho, M.D.L.R., 2003. Leishmaniose tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1), pp.71–80.
- Goto, H. & Lindoso, J.A.L., 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(APRIL), pp.419–433.
- Haring, J.S., Badovinac, V.P. & Harty, J.T., 2006. Inflaming the CD8+ T Cell Response. *Immunity*, 25(July), pp.19–29.
- Heltemes-Harris, L.M. et al., 2011. The role of STAT5 in the development, function, and transformation of B and T lymphocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1217(1), pp.18–31.
- Ibraim, I.C. et al., 2013. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from Leishmania braziliensis and Leishmania infantum trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasites & vectors*, 6, p.54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3606350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Imada, K. & Leonard, W.J., 2000. The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology*, 37(1-2), pp.1–11. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016158900000183>.
- Janeway, C. a. & Medzhitov, R., 2002. Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), pp.197–216. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>.
- Joshi, P.B. et al., 2002. Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Molecular and biochemical parasitology*, 120, pp.33–40.
- Kanakoudi-Tsakalidou, F. et al., 2001. Flow cytometric measurement of HLA-DR expression on circulating monocytes in healthy and sick neonates using monocyte negative selection. *Clinical and Experimental Immunology*, 123(3), pp.402–407.
- Kaplan, M.H., Wurster, a. L. & Grusby, M.J., 1998. A Signal Transducer and Activator of Transcription (Stat)4-independent Pathway for the Development of T Helper Type 1 Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 188(6), pp.1191–1196. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.188.6.1191>.
- Kaushal, H. et al., 2014. Role of CD8+ T cells in protection against Leishmania donovani infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. *BMC infectious diseases*, 14, p.653. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4258298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Kawai, T. & Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), pp.373–384. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1863>.
- Kébai, C. et al., 2001. Heterogeneity of Wild Leishmania major Isolates in Experimental Murine Pathogenicity and Specific Immune Response Heterogeneity of Wild Leishmania major Isolates in Experimental Murine Pathogenicity and Specific Immune Response. *Infection and Immunity*, 69(8), pp.4906–4915.
- Kolls, J.K. & Linde, A., 2004. Interleukin-17 Family Members. , 21, pp.467–476.
- Kulkarni, M.M. et al., 2015. Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) plays a critical role in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 145(2), pp.225–231. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12438>.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S., 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), pp.621–625. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.062>.
- Lieberman, J., 2003. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature reviews. Immunology*, 3(5), pp.361–370.
- Lopes, M.F., Costa-da-Silva, A.C. & DosReis, G.A., 2014. Innate Immunity to Leishmania Infection: Within Phagocytes. *Mediators of inflammation*, 2014, pp.754–965. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4119695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Maier, E., Duschl, A. & Horejs-Hoeck, J., 2012. STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization. *European Journal of Immunology*, 42(11), pp.2827–2833.
- Marzio, R. et al., 1999. Cd69 and Regulation of the Immune Function. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 21(3), pp.565–582. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/08923979909007126>.
- Marzochi, M.C. & Marzochi, K.B., 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthrozoosis and possibilities for their control. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*, 10 Suppl 2(Figure 2), pp.359–375.
- Mc, A.A. et al., 2009. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cellular and molecular immunology*, 6 (1)(February), pp.15–25.
- McCoy, K.D. & Le Gros, G., 1999. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. , 77, pp.1–10.
- Messaritakis, I. et al., 2010. Leishmania donovani s.l.: Evaluation of the proliferation potential of promastigotes using CFSE staining and flow cytometry. *Experimental Parasitology*, 125(4), pp.384–388. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.006>.
- Moreira, N.D.D. et al., 2012. Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of Leishmania (Leishmania) infantum: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. *PLoS ONE*, 7(10), pp.1–11.

- Mosser, D.M. & Handman, E., 1992. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. *Journal of leukocyte biology*, 52(4), pp.369–376.
- Mukherjee, A.K. et al., 2012. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: Role of TLR4 and TLR9. *International Immunopharmacology*, 12(4), pp.565–572. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.02.002>.
- Murphy, M.L. et al., 1998. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(8), pp.4153–4160.
- Murray, H.W. et al., 2013. Regulatory Actions of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 in *Leishmania donovani* infection in the liver. *Infection and Immunity*, 81(7), pp.2318–2326.
- Murray, P.J., 2006. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(II), pp.379–386.
- Naderer, T. & McConville, M.J., 2008. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. *Cellular Microbiology*, 10(2), pp.301–308.
- Oliveira, M. a P. et al., 2003. Immature macrophages derived from mouse bone marrow produce large amounts of IL-12p40 after LPS stimulation. *Journal of leukocyte biology*, 74(5), pp.857–867.
- De Oliveira-Neto, M.P. et al., 2000. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *International journal of dermatology*, 39(7), pp.506–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940114>.
- Pentcheva-Hoang, T. et al., 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*, 21(3), pp.401–413.
- Pereira, C.G. et al., 2009. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Veterinary Parasitology*, 165(3-4), pp.231–240.
- Peruhype-Magalhães, V. et al., 2006. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- γ and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infectio. *Clinical and Experimental Immunology*, 146(1), pp.124–132.
- Podinovskaia, M. & Descoteaux, A., 2015. *Leishmania* and the macrophage : a multifaceted interaction. *Future microbiology*, 10, pp.111–129.
- Ribeiro-de-Jesus, a. et al., 1998. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(1), pp.143–148.
- Ribeiro-Gomes, F.L. & Sacks, D., 2012. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(May), pp.1–8.
- Rogers, K. a. et al., 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiology Letters*, 209(1), pp.1–7. Available at: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/209/1/1.abstract>.
- Rojas-Bernabé, a et al., 2014. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology*, 141(6), pp.788–800. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24512642>.

- Rostami, M.N. et al., 2010. CD8 + T Cells as a Source of IFN- γ Production in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Plos neglected tropical diseases*, 4(10), pp.1–9.
- Sales, M. et al., 2015. Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon γ to Promote Protection Against *Leishmania infantum* Infection. *The Journal of infectious diseases*, 211, pp.1015–1026.
- Saraiva, E.M. et al., 2005. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. *Experimental Parasitology*, 110, pp.39–47.
- Schriefer, a. et al., 2004. Multiclonal *Leishmania braziliensis* Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 72(1), pp.508–514.
- Schroder, K. et al., 2004. Interferon- γ : an overview of signals , mechanisms and functions. *Journal of leukocyte Biology*, 75(February), pp.163–189.
- Scott, P. et al., 2004. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunol. Rev*, 201, pp.318–338.
- Da Silva Santos, C. & Brodskyn, C.I., 2014. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in public health*, 2(September), p.165. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4178373&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Soares, R.P.P. & Turco, S.J., 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75(3), pp.301–330.
- Souza, P.E. a et al., 2004. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infection and Immunity*, 72(9), pp.5283–5291.
- Späth, G.F. et al., 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania* major infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), pp.9536–9541.
- Srivastava, A. et al., 2012. Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania donovani* amastigote-specific antigens. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 359(1-2), pp.359–368.
- Srivastava, S. et al., 2013. *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clinical and Experimental Immunology*, 172(3), pp.403–409.
- Teixeira, M.J. et al., 2005. *Leishmania braziliensis* ., 73(2), pp.1191–1195.
- Tuon, F.F. et al., 2008. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 76(3), pp.866–872.
- De Veer, M.J. et al., 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: Possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *European Journal of Immunology*, 33(10), pp.2822–2831.
- Vieira, É.L.M. et al., 2013. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunology*, 35(2), pp.65–72.
- Vieira-Gonçalves, R. et al., 2008. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *International Journal of Dermatology*, 47(9), pp.926–932.

Weinkopff, T. et al., 2013. Role of toll-like receptor 9 signaling in experimental leishmania braziliensis infection. *Infection and Immunity*, 81(5), pp.1575–1584.

Who, 2010. Control of the leishmaniasis. *World Health Organization technical report series*, (949), pp.22–26.

Yagi, R., Zhu, J. & Paul, W.E., 2011. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *International immunology*, 23(7), pp.415–20.
Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3123974&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

9. ANEXOS

- Artigo enviado para publicação intitulado “Infection of human monocytes with *Leishmania i. chagasi* strains induces a down-modulated response as compared to infection with *Leishmania braziliensis*”. (Anexo 1)
- Artigo de revisão publicado como co-autor intitulado “Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection”. Publicado na revista *Parasite Immunology* 2014;36(8):367-376. (Anexo 2)
- Artigo publicado como co-autor intitulado “Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*”. Publicado na revista *PLoS Negl Trop Dis* 2015 9(7). (Anexo 3)

Anexo 1

Infection of human monocytes with *Leishmania i. chagasi* strains induces a down-modulated response as compared to infection with *Leishmania braziliensis*.

Agostinho Gonçalves Viana^a, Luísa Mourão Dias Magalhães^a, Rodolfo Cordeiro Giunchetti^a, Walderez O. Dutra^{a,b}, Kenneth J. Gollob^{b,c,d} #

^aLaboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ^bINCT-DT, Belo Horizonte, MG, Brazil; ^cNúcleo de Ensino e Pesquisa, Instituto Mario Penna, Belo Horizonte, MG, Brazil; ^dBRISA - Brazilian Research Institute for Scientific Advancement, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Running head: Human monocyte infection with *Leishmania* strains

#Address correspondence to:

Kenneth J. Gollob, Ph.D.

kjgollob@gmail.com

Keywords: Leishmania; strains; monocytes; cytokines, co-stimulatory molecules



Infection and
Immunity

Manuscript Submission
and Peer Review System

[home](#) | [help for authors](#) | [help for reviewers](#) | [contact IAI™ staff](#) | [IAI™ home](#) | [logout](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	IAI01559-15
Current Revision #	0
Submission Date	2016-01-11 09:22:40
Current Stage	Under Review
Title	Infection of human monocytes with <i>Leishmania chagasi</i> strains induces a down-modulated response as compared to infection with <i>Leishmania braziliensis</i>
Running Title	Human monocyte infection with <i>Leishmania</i> strains
Manuscript Type	Full-Length Text
Journal Section	Fungal and Parasitic Infections
Corresponding Author	Dr. Kenneth J Gollob (BRISA-Brazilian Research Institute for Scientific Advancement)
Contributing Authors	Mr. Agostinho Gonçalves Viana , Ms. Luisa Mourão Dias Magalhães , Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti , Dr. Walderez Ornelas Dutra

ABSTRACT

Human infection with different species of *Leishmania* leads to distinct clinical manifestations, ranging from relatively mild cutaneous (*Leishmania braziliensis*) to severe visceral (*Leishmania infantum chagasi*) forms of leishmaniasis. Here, we asked if *in vitro* infection of human monocytes by *Leishmania* strains responsible for distinct clinical manifestations leads to changes in immunological characteristics and ability of the host cells to control *Leishmania*. We evaluated the expression of toll-like receptors and MHC class II molecules, cytokines, and *Leishmania* control by human monocytes following short-term infection with the *L. braziliensis* (M2904), a reference strain of *L. i. chagasi* (BH46), and a wild strain of *L. i. chagasi* (wild). The induction of TLR2, TLR9 and HLA-DR were all lower in *L. i. chagasi* as compared to *L. braziliensis* infected cells. Moreover, *L. i. chagasi* infected monocytes (both strains) produced lower TNF-alpha and a lower TNF-alpha/IL-10 ratio, resulting in a weaker inflammatory profile and a 100 fold less effective control of *Leishmania* than cells infected with *L. braziliensis*. A positive correlation between the expression of TNF-alpha and TLR2 and TLR9 was observed in CD14-monocytes infected with *L. braziliensis*, but not those infected with *L. i. chagasi* strains. Our results show that *L. i. chagasi* strains fail to induce a strong inflammatory response, less activation, and less control of *Leishmania* from human monocytes, as compared to that induced by *L. braziliensis* infection. This functional profile may help explain the distinct clinical course observed in patients infected with the different *Leishmania* species.

INTRODUCTION

A dramatic variation of clinical manifestations upon *Leishmania* infection has been known for many years, suggesting that infection with either more than one species, or variants of the same species of *Leishmania* parasites leads to distinct clinical outcomes(1-3). Genetic ancestry studies have shown that the different species of *Leishmania* currently known have evolved from a common ancestor (4). Several factors can be associated with speciation within the *Leishmania* genus, but perhaps one of the most important is the evolutionary pressure posed by contact with different hosts. The different species of *Leishmania* not only display distinct morphological and biological characteristics, but are also associated with different patterns of human disease development. Most species of *Leishmania* can cause clinical disease, ranging from a spectrum of tegumentary forms (for example, *Leishmania braziliensis*), to severe and potentially deadly visceral disease (for example, *Leishmania infantum chagasi*) (1, 3, 4). Interestingly, while distinct clinical outcomes have been associated with infection by different species of *Leishmania*, studies have also demonstrated that the same parasite species can cause distinct disease manifestations depending on the host (5), and can lead to distinct clinical manifestations in humans due to different strains from the same species (6), as well as differential stimulatory activity *in vitro* (7). Furthermore, different isolates of *L. braziliensis* have been shown to induce distinct pathology in animal models (8, 9). These findings have important implications in understanding parasite biology, and also implicate the host immune response in disease evolution.

According to the WHO, there are an estimated 1.3 million total new cases of leishmaniasis observed each year in the world. Ninety percent are concentrated in only 6 countries, with Brazil being one of these highly endemic countries, where the tegumentary forms (cutaneous, mucosal and disseminated) are caused mainly due to infection with *L. braziliensis* and *L. amazonensis*, and visceral disease is caused by infection with *L. i. chagasi* (1). The tegumentary cutaneous form of leishmaniasis is characterized by the development of one or more ulcers at/near the site of infection, and is associated with a robust inflammatory response that has been associated with pathology (10-17). However, it is also associated with parasite control and in

association with therapy, leads to cure (3, 5). Mucosal leishmaniasis leads to destructive lesions in the naso and oropharyngeal mucosa, and is associated with a vigorous production of inflammatory cytokines, such as TNF-alpha and IFN-gamma, with less regulation of the response (18-20). Different from the tegumentary forms, visceral leishmaniasis is associated with a down-modulated immune response, in which IL-10 seems to play a critical role (21-24). This is the most severe form of leishmaniasis and, if not properly identified and treated, can lead to death. This demonstrates that the immune response plays an important role in disease development, persistence and cure.

Early contact between the parasite and the host, regardless of the infecting species, involves the entry of *Leishmania* into monocytes/macrophages. This interaction relies on a number of surface receptors such as Toll-like receptors and the complement receptor CD11b (25-27), and triggers several signaling pathways that influence the immune response mounted by the monocyte/macrophage. Between *Leishmania* species, different ligands for these and other receptors are expressed and, thus, their interaction with host cells may lead to distinct activation, which could explain differences in the resulting immune response (5, 28-30). In this work, we tested the hypothesis of whether *in vitro* infection of human monocytes by different species of *Leishmania* will lead to distinct phenotypic, functional immunological, and *Leishmania* control profiles in monocytes, and whether these profiles can help explain differential clinical form development observed in human infection. Our data show that infection with *L. i. chagasi* isolates leads to a preferential establishment of a modulatory environment and less *Leishmania* control, as compared to *L. braziliensis*, which can be associated with the immune response observed in patients with visceral and tegumentary disease, respectively, suggesting that the early events triggered by the infection with different parasite species may drive the resulting response observed in human infection.

MATERIAL AND METHODS

Human blood samples and preparation of peripheral blood cells

Peripheral blood was obtained by venipuncture from a total of 10 healthy volunteers from Belo Horizonte, MG Brazil composed of, five males and five females, into tubes containing sodium heparin. The mean age of the donors was 29.4 +/- 7 years of age, ranging between 21 and 45 years. This study was approved by the National Ethical Committee (CONEP # CAAE 01229212.0.0000.0049).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained as previously performed by us (31). Briefly, peripheral blood was diluted 1:1 with phosphate buffered saline (PBS) and slowly layered over Ficoll-Paque (GE Healthcare, Piscataway, USA). Tubes were centrifuged at 200g for 40 minutes at 20°C. After centrifugation, PBMC were harvested, washed three times by centrifugation with PBS, and resuspended in RPMI medium supplemented with antibiotics (penicillin 200U/mL and streptomycin 0.1mg/ml), 1 mM L-glutamine and 10% inactivated human serum (complete RPMI media - cRPMI). Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion. Cells were counted in hemacytometer and concentration adjusted to 10^7 cells/ml for plating in cultures.

Parasites

Two of the parasite strains used in this work were obtained from World Health Organization repository and belonged to the species of greatest medical importance in Brazil, *Leishmania (V.) braziliensis* (strain: MHOM/BR/1975/M2904, refereed to in the text and figures as L.b. 2904) and *Leishmania (L.) infantum chagasi* (strain: MHOM/BR/1972/BH46, refereed to in the text and figures as L.c. BH46). We also used a wild strain of *Leishmania (L.) infantum chagasi* isolated from dogs naturally infected by *L. i. chagasi* from the endemic region of Governador Valadares, MG, Brazil, (refereed to in the text and figures as L.c. wild). Parasites were grown in Schneider medium (Sigma-Aldrich) pH 7.2 containing 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic (penicillin 200U/ml). All experiments were carried out between the 5th and 7th passage of

parasite culture. Cultures were carried out in plastic bottles in a biochemical oxygen demand (BOD) incubator at 23°C. Cultures were monitored daily and parasites were harvested at the stationary phase for *in vitro* infection.

Infection of PBMC with different strains of *Leishmania*

Promastigote forms from the different *Leishmania* isolates were labeled with the dye CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester - Molecular Probes C1157), as previously described by us (32). Briefly, *Leishmania* parasites were resuspended at 6×10^7 parasites/ml and CFSE was added to the tube in the final concentration of 5 μ M. Samples were incubated in CO₂ incubator at 37°C for 15 minutes. Then, the parasites were washed three times by centrifugation at 200g with ice-cold PBS plus 10% inactivated fetal calf serum (Sigma Aldrich Chemicals, St. Louis, MO, USA), and resuspended in cRPMI. Parasites alone were then run on the flow cytometer to determine staining efficiency and intensity (Figure 1).

A proportion of 10 CFSE-labeled parasites/cell was used for *in vitro* infection of individual donor cells. The frequency of metacyclic promastigotes ranged between 78-81% in all preparations for all the isolates evaluated here as determined by morphologic characteristics, as well as flow cytometry profiles (33). Cultures of PBMC and parasites, or PBMC alone, were carried out using cRPMI media, in a humidified incubator at 5% CO₂ at 37°C. After 4 hours of culture, cells were run on the flow cytometer for determination of initial infection intensity by determining the percentage of infected monocytes (Figure 1). After approximately 12 hours of culture, Brefeldin A was added (1 μ l/ml) to samples, which were re-incubated for an additional 4 hours, totaling 16 hours of culture. After infection, cells were washed with PBS by centrifugation (200g, 10 minutes at 4°C) and resuspended in PBS at a concentration of 10^7 cells/ml for subsequent plating and staining. A total of ten donors in five different experiments were used for these studies.

Staining of surface and intracellular molecules

2×10^5 PBMC/well for each donor and each culture condition, obtained as described above, were incubated in a 96 round-bottom well plate with monoclonal antibodies directed against surface molecules (CD14, CD80, CD86,

HLA-DR, TLR2), labeled with different fluorochromes, for 15 minutes at 4° C. Once labeled, the samples were washed in PBS and fixed by incubation with 200 µl of PBS containing 2% formaldehyde for 20 minutes. Thereafter, cells were washed with PBS, permeabilized with a 0.5% saponin-PBS solution for 15 minutes at 4°C, centrifuged, and incubated with monoclonal antibodies for intracellular molecules (TNF-α, IL-12p40, IL-10 and TLR9) for 30 minutes at 4 °C. Cells were then washed twice with saponin-PBS, resuspended in PBS and acquired using a BD FACSCanto II equipped with BD FACSDiva 6.0 software (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA). We acquired a minimum of 30,000 gated events for each sample. All monoclonal antibodies, including isotype controls used in all reactions, were from BioLegend (San Diego, CA). A total of six donors in three different experiments were used for these studies. After acquisition of the samples, the data were analyzed using the FlowJo 7.6.5 program.

Leishmania control assays

2×10^5 PBMC from four donors in two different experiments were cultured with 2×10^6 *Leishmania* of each strain as performed for the cultures used to determine monocyte surface molecule and cytokine expression. At the same time point used for these measurements (16 hours), cultures were centrifuged at 200g for 10 minutes at 4°C and resuspended in 300ul of Schneider's media and placed in the first well of a 96 well flat bottom plate. Following this, the wells were used to begin 1:3 serial dilutions by transferring 100ul from the first well into 200ul of Schneider's media in the adjacent well, and continuing down the plate until the 24th well. The plates were then incubated in the BOD incubator at 23°C and after five days of culture the plates were scored for the last dilution with detectable *Leishmania* growth using an inverted light microscope. Controls of *Leishmania* alone were used, and no significant difference was seen between the three strains in their growth upon 1:3 dilutions. This was used to calculate the fold difference in *Leishmania* between cultures infected with the different strains by setting the dilution with *Leishmania* positivity as 1 for *L. braziliensis* cultures (which was the dilution 1:2187).

Statistical analysis

ANOVA One-way paired analysis of variance, followed by multiple comparison test of Tukey, was applied to all comparisons, as they followed a normal distribution. Pearson test was used for all correlation analysis. Data were considered significant when the p value was less than or equal to 0.05. The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.0® software.

RESULTS

***L. braziliensis* infection induced greater down modulation of CD14 in infected monocytes than did the *L. i. chagasi* strains**

In order to determine the infectivity profile of each *Leishmania* isolate, we labeled promastigotes from *L. braziliensis* – 2904 (L.b. 2904), *L. i. chagasi* – Wild (L.c. wild) and *L. i. chagasi* - BH46 (L.c.-BH46) strains with CFSE and incubated with PBMC *in vitro*. After 4 hrs of infection, the cells were washed and stained for anti-CD14 to determine the percent of infected cells immediately following infection (Figures 1 and 2). In addition, parallel cultures were left for a total of 16 hrs of infection and used for the subsequent measurements of surface molecule expression, cytokine production, and *Leishmania* control. Infection was measured as the percent of CFSE+ cells within the monocyte gate, and within monocyte subpopulations based on CD14 expression (Figure 1). After 4 hrs of infection the percentage of CFSE+ infected monocytes by *L. braziliensis* (99.6 +/- 0.2) and the *L. i. chagasi* strains, L.c.-BH46 (97.6% +/- 1.7) and L.c. wild (97.5% +/- 1.2), was statistically equivalent (Figures 1B and 2A). However, following 16 hours slight differences in infection intensity were seen (Figure 2B). The difference in intensity of CFSE staining on infected monocytes seen between the *L. braziliensis* strain (L.b. 2904) and the *L. i. chagasi* strains (Figure 1B) was due to the greater intensity of staining of L.b. 2904 as seen in Figure 1A, and did not reflect a substantial difference in the percentage of infected monocytes between the three strains when considering all CFSE+ infected monocytes (Figures 1B and 2A,B). Furthermore, at both 4 hrs and 16 hrs after infection with any of the *Leishmania* strains, an increase in the percentage of CD14- monocytes, and a corresponding decrease in the

percentage of CD14+CFSE+ cells is seen as compared to control uninfected cultures (Figure 3A,B). At 16 hours this down modulation of CD14 is most dramatic with L.b. 2904 inducing the greatest down modulation (87.6% +/- 5.6 CD14-CFSE+), followed by the *L. i. chagasi* strains, L.c. wild (44.4 +/- 15.4) and L.c. BH46 (37.0 +/- 11.9) (Figure 3B).

Human monocytes infected with *L. i. chagasi* strains display lower expression of activation molecules as compared to monocytes infected with *L. braziliensis*

To determine the activation state of CD14+ and CD14- monocytes infected with the different strains, we evaluated the mean intensity fluorescence (MFI) expression of a series of activation-related molecules such as TLR2, TLR9, HLA-DR and the co-stimulatory molecule ligands, CD80 and CD86, by the different cell populations after infection with *L. braziliensis* or the *L. i. chagasi* strains.

With the exception of CD80 expression, infection by *L. braziliensis* leads to a higher intensity of expression of all analyzed molecules as compared to *L. i. chagasi* strains (Figure 4A, C, E, G) among the CD14- monocytes. Similar results were observed in the CD14+ population, where infection with *L. braziliensis* lead to a higher intensity of expression of TLR2, TLR9 and HLA-DR, as compared to the *L. i. chagasi* strains (Figure 4B, D and F). Expression of CD80 by infected CD14- or CD14+ cells was higher in *L. i. chagasi* strains as compared to non-infected, while *L. braziliensis* infected cells did not up regulate CD80 significantly (Figure 4I and J). Interestingly, CD86 was lower in CD14+ cells infected with L.c. wild as compared to the other strains (Figure 4H).

Infection with L.c. wild lead to a lower expression of TLR2, TLR9 and CD80 than L.c. BH46 (Figure 4A, C, and I) amongst the CD14- monocytes. With the exception of CD86 (Figure 4H), no differences were observed in the expression of the activation molecules in CD14+ cells infected with L.c. wild or L.c. BH46.

Thus, in summary, *L. braziliensis* increases the expression of activation molecules in both CD14- and CD14+ infected cells as compared to the *L. i. chagasi* strains, and L.c. wild leads to a lower expression of activation molecules in infected CD14- cells, as compared to L.b. 2904s and to L.c. BH46.

CD14⁺ monocytes express higher levels of activation markers as compared to CD14⁻ monocytes, regardless of the infecting strain of *Leishmania*

Subsequently, we analyzed whether there were differences in the intensity of expression of activation-related molecules comparing between the two subpopulations of monocytes infected with the different strains based on CD14 expression (CD14⁻ vs. CD14⁺).

We observed that while a few comparisons did not show statistically significant results, in general, there was a clear pattern of lower expression of activation molecules in CD14⁻ as compared to CD14⁺ monocytes, regardless of the species and isolate of *Leishmania* used in the infection (Table 1). These phenotypic differences suggested that these cells could display distinct functional properties.

Infection of human monocytes with *L. i. chagasi* strains leads to less production of TNF-alpha and a lower TNF-alpha/IL-10 ratio, as compared to *L. braziliensis*

After observing the changes in the phenotypic expression of activation markers, which were generally reduced by infection with *L. i. chagasi*, we sought to determine if the infection with the different isolates led to a differential expression of immunoregulatory cytokines by monocytes upon infection.

Our results showed that expression of IL12/IL23p40 by infected CD14⁻ and CD14⁺ monocytes was similar when comparing the different isolates (Figure 5A and B). However, *L. braziliensis* induced higher frequency of CD14⁻ monocytes expressing TNF-alpha as compared to the *L. i. chagasi* strains (Figure 5C), while the expression of TNF-alpha was higher in both L.b. 2904 and *L.c. wild* isolate in CD14⁺ cells, as compared to L.c. BH46 (Figure 5D). While all strains induced an increase in IL-10 expression as compared to control CD14⁻ monocytes, L.c. wild led to a higher expression of IL-10 in CD14⁺ cells, as compared to L.c. BH46 (Figures 5F).

To gain a better measure of immunoregulatory balance, we analyzed the TNF-alpha/IL-10 ratio and found that both *L. i. chagasi* strains induced a lower TNF-alpha/IL-10 ratio in CD14⁻ and CD14⁺ monocytes as compared to infection

with *L. braziliensis* (Figure 5G and H). Comparing the two isolates of *L. i. chagasi*, we observed that the TNF-alpha/IL-10 ratio was lower in CD14+ and CD14- infected monocytes infected with L.c. BH46 as compared to L.c. wild (Figure 5G and H).

Seeking to determine whether there was relationship between the expression of activation molecules expression and cytokine production, correlation analyzes were performed between these variables. A positive correlation between the expression of TLR2⁺/TNF-alpha⁺ and TLR9⁺/TNF-alpha⁺ was observed when CD14- monocytes were infected with the *L. braziliensis* strain (Figure 6A). However, the CD14+ infected monocytes only showed a correlation between TLR2/TNF-alpha among monocytes infected with L.b. 2904 or L.c. wild (Figure 6B). No other positive or negative correlations were found between other activation molecules and cytokines (not shown).

L. i. chagasi* infected monocyte cultures were greater than a hundred fold less effective at controlling *Leishmania* than those infected with *L. braziliensis

To determine the functional consequences of the down modulatory profile of monocytes infected with *L. i. chagasi* (less activation and less inflammatory cytokine production) as compared to *L. braziliensis* infected monocytes, we measured the ability of cultures to control *Leishmania* parasites following the overnight cultures.

Infected monocyte cultures from four donors were submitted to serial dilutions in Schneider's media to determine relative ability to control *Leishmania* in cultures infected with the three strains. The last *Leishmania* positive well was scored as 1 from cultures infected with L. b. 2904 (dilution 1:2187) and the fold increase or decrease in *Leishmania* calculated using the last serial dilution well with positive growth for the other two strains, L.c. wild and L.c. BH46. Using four different PBMC donors the average relative *Leishmania* of cultures from L.c. wild (dilutions 1:531,441 to 1,594,323) and L.c. BH46 (dilutions 1:177,147 to 531,441) were 607 fold and 122 fold higher, respectively, as compared to L.b. 2904. Thus, while given equivalent initial infections, the *L. i. chagasi* infected monocyte cultures were over 100 fold less effective at controlling *Leishmania* than the *L. braziliensis* infected cultures.

DISCUSSION

This work was designed to investigate whether distinct species and strains of *Leishmania* induce differential activation upon infection of human monocytes *in vitro*. Our hypothesis was that if there were differences in the response induced by the different strains, that they could help explain distinct immune responses and subsequent clinical forms observed in human infection with *L. braziliensis* (potential for tegumentary forms of disease) vs. *L. i. chagasi* (potential to develop visceral disease). First, we investigated the infection intensity and its relation to monocyte subpopulations based on CD14 expression. For this, the infectivity of the strains was characterized using CFSE-labeled promastigotes and analyzing the percentage of infected monocytes as those expressing fluorescence due to CFSE-labeled *Leishmania* (both medium to high intensity). Previous studies have shown that *Leishmania* promastigote-macrophage interaction can be measured when the parasites are stained with CFSE and analyzed by flow cytometry (34, 35). While there is a range of intensities of CFSE+ *Leishmania* infected monocytes between the strains, the percentage of infected monocytes was equivalent between the strains at 4 hours following infection (Figures 1 and 2A) and a very slight difference at 16 hrs. Interestingly, the apparent increase in infection intensity (MFI) by *L. braziliensis* was due to an inherent increased intensity of CFSE staining of that strain as compared to the *L. i. chagasi* strains (Figure 1). Thus, the relative infection intensity and percentage of infected monocytes was equivalent between the strains, and differences in infection intensity do not explain the differences seen in activation, cytokine profiles and *Leishmania* control. While there were no significant differences between infection intensity of the strains, it is well known that the surface of different species of *Leishmania* is decorated with numerous GPI-linked complex molecules that are associated with interaction, survival and virulence in the host cell (5, 28). Glycoprotein 63 (gp63) and the lipophosphoglycan (LPG) are two of the most abundant molecules, which are primarily responsible for the virulence of the parasite (28, 36). The existence of differences between the intra- and inter- *Leishmania* species structure of these molecules may influence the parasite-host cell interaction and, in turn, the establishment of infection (29, 30).

Several studies have demonstrated that human monocytes/macrophages display phenotypic and functional heterogeneity upon activation (37). When we evaluated the effects of infection on the expression of CD14 by infected monocytes we found that *L. braziliensis* infection lead to a dramatic down-regulation of CD14 and a subsequent higher frequency of CD14⁻ infected monocytes as compared to that induced by infection with the *L. i. chagasi* strains or control cultures (Figure 3). This down regulation of CD14 upon infection was seen at 4 hours (Figures 3A) after infection and potentiated after 16 hours (Figures 3B). This down-modulation of CD14 could be a result of activation, as previously shown (38), and thus, we evaluated the expression of surface molecules associated with activation in the CD14⁺ and CD14⁻ cells infected with the different isolates. Souza *et al*, assessed the functional and phenotypic characteristics of CD14⁺ and CD14⁻ monocytes from Chagas patients and showed that these cells present differences in the expression of activation molecules and cytokines, demonstrating that these monocytes are functionally different (38).

Despite the fact that *L. braziliensis* indeed leads to higher expression of activation molecules such as TLRs, HLA-DR and co-stimulatory ligands, as compared to the *L. i. chagasi* isolates, the increases were observed in both CD14⁺ and CD14⁻ subpopulations. Moreover, when we compared the intensity of expression of activation-related molecules between CD14⁺ and CD14⁻ subpopulations, we observed a general decrease in the expression of these molecules in CD14⁻ cells (Table 1). This same activity has also been attributed to other trypanosomatides (39). The fact that the *L. i. chagasi* isolates lead to an even lower expression of the activation markers, especially TLR2, TLR9 and HLA-DR, as compared to *L. braziliensis*, are also in accordance with the fact that this parasite triggers a down-regulated cellular response *in vivo* in experimental models, as well as in human disease (40, 41). Expression of the co-stimulatory molecule ligands, CD80 and CD86, which are primarily expressed on the surface of antigen presenting cells further support this hypothesis. These molecules are responsible for delivering the second signal for the activation and proliferation/control of T lymphocytes through binding to their receptors, CD28 and CTLA-4, respectively (42). Interestingly, we found that monocytes infected with the L.c. wild strain displayed a lower expression of

CD86. Strikingly, when we evaluated the expression of CD80, we observed that the L.c. BH46 strain induced a higher expression of this molecule in CD14⁺ monocytes compared with the other isolates, as well as with the control. It has been shown that CD80 binds preferentially to CTLA-4 leading to an inhibition of lymphocytes, while CD86 binds preferentially CD28, promoting lymphocyte activation (43). Therefore, the lower expression of CD86 and the higher expression of CD80 by monocytes infected with L.c. wild and L. c. BH46, may contribute to a low T cell response observed in *L. i. chagasi* infection. This conclusion is also supported by others who found that canine monocytes infected with *L. infantum* display a decreased expression of co-stimulatory molecules, thus undermining T cell activation (44). A decreased T lymphocyte activation, possibly caused by a decrease in CD86 and an increase in CD80 expression, is consistent with the findings observed in human visceral leishmaniasis.

TLRs are responsible for specific recognition of pathogen-derived antigens, and can alter the expression of immunoregulatory cytokines (45). TLR2, TLR4 and TLR9 are the main receptors involved in the recognition of *Leishmania* molecules (12, 27, 45, 46). In this study, we observed that monocytes infected with *L. braziliensis* showed increased expression of TLR2 and TLR9 compared with those infected with the *L. i. chagasi* strains. Becker *et al* showed that *L. major* LPG can be recognized by TLR2 on NK cells, trigger cell activation and further increase the levels of TLR2 on its surface (47). LPG purified from *L. major* has been proven to be the main TLR2 agonist, since this receptor participates in the recognition of *Leishmania* and activation of an important pathway in infection control (48). Thus, it is possible that TLR2 is also involved in *L. braziliensis* recognition. Few studies have evaluated TLR expression in visceral leishmaniasis, therefore, our results showing the increase of TLR2 after infection of monocytes by *L. i. chagasi*, as compared to non-infected cultures, indicate that these receptors may also be involved in the recognition of the parasite (49, 50). TLR9 is essential for disease control and parasite replication in experimental models. TLR9 deficient mice develop severe lesions and have high parasite load when infected with *L. braziliensis* (51). Studies in human disease have shown that patients with visceral leishmaniasis present an increase in TLR4 and TLR9 expression after treatment with

miltefosine, generating a strong pro-inflammatory response which is important in disease resolution (52). Moreover, monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis due to *L. braziliensis* infection display a high expression of TLR9, suggesting a role for this molecule in active disease (12). Here we observed that infection with *L. braziliensis* leads to a higher expression of TLR9, as compared to *L. i. chagasi* strains. This fact may favor the generation of a more effective inflammatory response at *Leishmania* killing. The positive correlation observed between expression of TLR9 and TNF-alpha in monocytes infected with *L. braziliensis*, but not *L. i. chagasi* strains, strengthens this hypothesis.

A protective immune response against leishmaniasis has been associated with an efficient cell response resulting in the production of cytokines such as IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha that leads to activation of macrophages and parasite elimination (53). However, there is an association of increased expression of IFN-gamma, activated T cells and monocytes and lesion size in cutaneous leishmaniasis, indicating that despite the fact that a strong inflammatory response is important for parasite control, it can also lead to tissue destruction (12, 14, 54). In contrast, a modulatory immune response, characterized by the production of IL-10, is a hallmark of visceral leishmaniasis (24, 55). In this study we evaluated the expression of IL-12/IL-23p40, TNF-alpha and IL-10 by infected monocytes, to determine if the different strains would lead to distinct functional cytokine expression, which could influence the overall environment and, thus, the subsequent immune response. Infection with the three isolates led to a high expression of IL-12, possibly indicating activation, as previously observed (56). CD14- monocytes infected by *L. braziliensis* infected CD14- monocytes showed an increased expression of TNF-alpha compared to monocytes infected by the *L. i. chagasi* strains. While the L.c. wild strain led to equivalent TNF-alpha expression by CD14+ *L. braziliensis* infected monocytes, L.c. BH46 infected monocytes led to no increase in TNF-alpha expression as compared to non-infected cultures. The higher expression of TNF-alpha by the L.c. wild strain is unexpected and further molecular characterization of this isolate may clarify this question. A clear increase in IL-10 expression was observed after infection with all isolates in CD14+ cells, even more pronounced by the infection with L.c. wild strain. Despite the importance of the expression of the individual cytokines, the

balance between the production of inflammatory versus anti-inflammatory cytokines provides important information with respect to the predominant microenvironment. When we analyzed the TNF-alpha/IL-10 ratio, we observed that *L. braziliensis* infected monocytes displayed an approximately 2 fold higher ratio, indicating a greater inflammatory environment, as compared to that induced by *L. i. chagasi* infected monocytes. This is consistent with the characteristics observed in human infection, in which patients with tegumentary forms of leishmaniasis due to *L. braziliensis* infection display an inflammatory response with response associated pathology, while patients with visceral disease display a down-modulated environment. The use of this relatively reductionist model of *in vitro* infection, suggests that the type of immune response observed in tegumentary and visceral leishmaniasis (higher activation and inflammatory profile *versus* lower activation and less inflammatory, respectively) can be defined early on. The identification of the parasite molecules responsible for these differences in the activation process is an important point to be addressed. Furthermore, strategies that can interfere with this response at early stages may be beneficial for disease control.

Funding information

This work was supported by FAPEMIG, CNPq and CAPES. KJG, RCG and WOD are recipients of CNPq research fellows award. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

References

1. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-77
2. Reithinger RDJ-CP, Claude. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet infect dis* 7: 581-96
3. Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. 2014. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. *Parasite immunology*: 367-76
4. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39: 839-47
5. Kaye P, Scott P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology* 9: 604-15
6. Schriefer a, Schriefer aLF, Góes-Neto a, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa Ha, Ribeiro De Jesus a, Riley LW, Carvalho EM. 2004. Multiclonal *Leishmania braziliensis* Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. *Infection and Immunity* 72: 508-14
7. Souza AS, Giudice A, Pereira JM, Guimaraes LH, de Jesus AR, de Moura TR, Wilson ME, Carvalho EM, Almeida RP. 2010. Resistance of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-alpha production. *BMC Infect Dis* 10: 209
8. Pereira CG, Silva ALN, de Castilhos P, Mastrantonio EC, Souza Ra, Romão RP, Rezende RJ, Pena JDO, Beletti ME, Souza Ma. 2009. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Veterinary Parasitology* 165: 231-40
9. Kébai C, Louzir H, Chenik M, Salah aB. 2001. Heterogeneity of Wild *Leishmania major* Isolates in Experimental Murine Pathogenicity and Specific Immune Response Heterogeneity of Wild *Leishmania major* Isolates in Experimental Murine Pathogenicity and Specific Immune Response. *Infection and Immunity* 69: 4906-15
10. Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology letters* 101: 226-30
11. Faria D, Gollob K, Barbosa J, Schriefer A, Machado P, Lessa H, Carvalho L, Romano-Silva M, de Jesus A, Carvalho E, Dutra W. 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with

- the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and Immunity* 73: 7853-9
12. Vieira ELM, Keesen TSL, Machado PR, Guimaraes LH, Carvalho EM, Dutra WO, Gollob KJ. 2013. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunology* 35: 65-72
 13. Oliveira F, Bafica A, Rosato AB, Favali CB, Costa JM, Cafe V, Barral-Netto M, Barral A. 2011. Lesion size correlates with Leishmania antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 85: 70-3
 14. Soares G, Barral A, Costa JM, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J. 2006. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol* 79: 36-9
 15. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-40
 16. Keesen TS, Antonelli LR, Faria DR, Guimaraes LH, Bacellar O, Carvalho EM, Dutra WO, Gollob KJ. 2011. CD4(+) T cells defined by their Vbeta T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 165: 338-51
 17. Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG. 2005. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol* 153: 537-43
 18. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, de Jesus A, Dutra W, Gollob K, Carvalho E. 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity* 70: 6734-40
 19. Gaze S, Dutra W, Lessa M, Lessa H, Guimaraes L, de Jesus A, Carvalho L, Machado P, Carvalho E, Gollob K. 2006. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scandinavian Journal of Immunology* 63: 70-8
 20. Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhaes A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado P, de Jesus AR. 2007. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol* 29: 251-8
 21. Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, Costa J, Barral-Netto M, Barral A. 2005. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis* 5: 113
 22. Singh OP, Gidwani K, Kumar R, Nylén S, Jones SL, Boelaert M, Sacks D, Sundar S. 2012. Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. *Clin Vaccine Immunol* 19: 961-6
 23. Gautam S, Kumar R, Maurya R, Nylén S, Ansari N, Rai M, Sundar S, Sacks D. 2011. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 204: 1134-7
 24. Bacellar O, D'oliveira a, Jerônimo S, Carvalho EM. 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 12: 1228-31

25. Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrli ME, Mosser DM. 1996. Leishmania major-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect Immun* 64: 2206-15
26. de Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. 2003. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 861-70
27. Srivastava S, Pandey SP, Jha MK, Chandel HS, Saha B. 2013. Leishmania expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clinical and Experimental Immunology* 172: 403-9
28. Isnard A, Shio MT, Olivier M. 2012. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2: 1-9
29. De Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco SJ. 2012. Glycoconjugates in New World species of Leishmania: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1820: 1354-65
30. Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MN, Turco SJ, Soares RP. 2013. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from Leishmania braziliensis and Leishmania infantum trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasites & vectors* 6: 54
31. Antonelli LR, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KC, Guimaraes LH, Bacellar O, Gollob KJ. 2006. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4- CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 74: 6317-23
32. Goncalves R, Vieira ER, Melo MN, Gollob KJ, Mosser DM, Tafuri WL. 2005. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of L. chagasi to canine peritoneal macrophages. *BMC Infect Dis* 5: 39
33. Saraiva EM, Pinto-da-Silva LH, Wanderley JL, Bonomo AC, Barcinski MA, Moreira ME. 2005. Flow cytometric assessment of Leishmania spp metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. *Exp Parasitol* 110: 39-47
34. Gonçalves R, Vieira ER, Melo MN, Gollob KJ, Mosser DM, Tafuri WL. 2005. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of L. chagasi to canine peritoneal macrophages. *BMC infectious diseases* 5: 39
35. Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, Coelho JS, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. 2007. Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun* 75: 1886-94
36. Naderer T, McConville MJ. 2008. The Leishmania-macrophage interaction: A metabolic perspective. *Cellular Microbiology* 10: 301-8
37. Podinovskaia M, Descoteaux A. 2015. Leishmania and the macrophage : a multifaceted interaction. *Future microbiology* 10: 111-29
38. Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. 2004. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and

- functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun* 72: 5283-91
39. Souza PEa, Rocha MOC, Rocha-Vieira E, Menezes CaS, Chaves ACL, Gollob KJ, Dutra WO. 2004. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infection and Immunity* 72: 5283-91
 40. Kaye PM, Aebischer T. 2011. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clin Microbiol Infect* 17: 1462-70
 41. Holaday BJ, Pompeu MM, Jeronimo S, Texeira MJ, Sousa Ade A, Vasconcelos AW, Pearson RD, Abrams JS, Locksley RM. 1993. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. *J Clin Invest* 92: 2626-32
 42. Elloso MM, Scott P. 1999. Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162: 6708-15
 43. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21: 401-13
 44. Diaz S, da Fonseca IP, Rodrigues A, Martins C, Cartaxeiro C, Silva MJ, de Brito TV, Alexandre-Pires G, Santos-Gomes GM. 2012. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. *Veterinary Parasitology* 189: 137-44
 45. Tuon FF, Fernandes ER, Duarte MIS, Amato VS. 2012. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary american leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 54: 159-64
 46. Murray HW, Zhang Y, Zhang Y, Raman VS, Reed SG, Ma X. 2013. Regulatory Actions of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 in *Leishmania donovani* infection in the liver. *Infection and Immunity* 81: 2318-26
 47. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A. 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and Biochemical Parasitology* 130: 65-74
 48. de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato Ja, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: Possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *European Journal of Immunology* 33: 2822-31
 49. Gatto M, de Abreu MM, Tasca KI, de Assis Golim M, da Silva LDM, Simão JC, Fortaleza CMCB, de Campos Soares ÂMV, Calvi SA. 2015. The Involvement of TLR2 and TLR4 in Cytokine and Nitric Oxide Production in Visceral Leishmaniasis Patients before and after Treatment with Anti-Leishmanial Drugs. *Plos One* 10: e0117977
 50. Cezário GAG, de Oliveira LRC, Peresi E, Nicolete VC, Poletini J, de Lima CRG, Gatto M, Calvi SA. 2011. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106: 573-83

51. Weinkopff T, Mariotto A, Simon G, Torre YHL, Auderset F, Schuster S, Zangger H, Fasel N, Barral A, Tacchini-Cottier F. 2013. Role of toll-like receptor 9 signaling in experimental leishmania braziliensis infection. *Infection and Immunity* 81: 1575-84
52. Mukherjee AK, Gupta G, Adhikari A, Majumder S, Kar Mahapatra S, Bhattacharyya Majumdar S, Majumdar S. 2012. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: Role of TLR4 and TLR9. *International Immunopharmacology* 12: 565-72
53. Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. 2012. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2: 1-8
54. Antonelli L, Dutra W, Almeida R, Bacellar O, Carvalho E, Gollob K. 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology Letters* 101: 226-30
55. Nylén S, Sacks D. 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28: 378-84
56. Abel LC, Ferreira LR, Cunha Navarro I, Baron MA, Kalil J, Gazzinelli RT, Rizzo LV, Cunha-Neto E. 2014. Induction of IL-12 production in human peripheral monocytes by *Trypanosoma cruzi* is mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins and potentiated by IFN- γ and CD40-CD40L interactions. *Mediators Inflamm* 2014: 345659

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Gating strategy and determination of infection intensity of human PBMC derived monocytes using CFSE labeled parasites. Panel A shows a representative staining and mean fluorescent intensity (MFI) of *Leishmania* stained with CFSE, a green fluorescing intracellular dye. Stained *Leishmania* are displayed and gated on SSC vs. FSC parameters and then the MFI is determined in a FL1-green fluorescence histogram. The MFI for L.b. 2904 is intrinsically higher than that seen for L.c. wild or L.c. BH46. Panel B shows the CFSE vs. CD14 dot plots used to delineate quadrants for determining the percentage of infected monocytes using CFSE+ monocytes expressing CD14+ or not (CD14-). The higher intensity of CFSE staining seen in L.b. 2904 is reflected in the fluorescent intensity of infection with the three strains, however, by gating on total CFSE+ events, the percentage of infected cells can be determined. This is a representative experiment using one donor (n=6).

Figure 2. Initial infection between *Leishmania* strains was equivalent. Following 4 hours or 16 hours of *Leishmania* infection of PBMC with three strains, the percentage of infected monocytes was determined using flow cytometry. Panel A shows the percentage of infected monocytes at 4 hrs as determined by CFSE+ monocytes (n=4 donors). Panel B shows the percentage of infected monocytes at 16 hrs as determined by CFSE+ monocytes (n=6 donors). Results are expressed as mean \pm standard deviation. The horizontal brackets indicate a statistically significant difference ($p \leq 0.05$) between the pairs, using paired One Way ANOVA test with Tukey correction for multiple comparisons.

Figure 3. Monocyte infection with *Leishmania braziliensis* leads to a dramatic down regulation of CD14 at 4 hours and 16 hours post infection. Panel A shows the percentage of CD14⁺ infected (CFSE⁺) and CD14⁻ infected (CFSE⁺) monocytes following 4 hours of infection with the three *Leishmania* isolates and control cells (n=4). Panel B shows the same measurements at 16 hours of infection (n=6). Results are expressed as mean \pm standard deviation. The horizontal brackets indicate a statistically significant difference ($p \leq 0.05$) between the pairs, using paired One Way ANOVA test with Tukey correction for multiple comparisons.

Figure 4. Analysis of expression of the activation-related markers TLR-2, TLR-9, HLA-DR, CD86, CD80 by monocytes before and after infection with different *Leishmania* isolates. Molecule expression as determined by calculation of mean fluorescent intensity (MFI) using flow cytometry and gating on the corresponding infected monocyte population. Expression of TLR-2 in CD14⁻ (A) and CD14⁺ (B) monocytes. Expression of TLR-9 in CD14⁻ (C) monocytes and CD14⁺ (D) monocytes. Expression HLA-DR in CD14⁻ (E) and CD14⁺ (F) monocytes. Expression of CD86 in CD14⁻ (G) and CD14⁺ (H) monocytes. Expression of CD80 in CD14⁻ (I) and CD14⁺ (J) monocytes. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=6 donors). The horizontal brackets indicate statistically a significant difference ($p \leq 0.05$) between the pairs, using paired One Way ANOVA test with Tukey correction for multiple comparisons.

Figure 5. Analysis of the frequency of monocytes expressing the immunoregulatory cytokines, IL12/IL23p40, TNF-alpha, and IL10, before and after infection with different *Leishmania* isolates. The percentage of cytokine expressing infected monocytes was determined by gating on the corresponding population. Expression of IL12/IL23p40 in CD14⁻ (A) and CD14⁺ (B) monocytes. Expression of TNF in CD14⁻ (C) monocytes and CD14⁺ (D) monocytes. Expression IL-10 in CD14⁻ (E) and CD14⁺ (F) monocytes. Ratio of TNF-IL-10- expression in CD14⁻ (G) and CD14⁺ (H) monocytes. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=6 donors). The horizontal brackets

indicate statistically a significant difference ($p \leq 0.05$) between the pairs, using paired One Way ANOVA test with Tukey correction for multiple comparisons.

Figure 6. Correlation analysis between expression of TLR2 and TLR9 with TNF in CD14- and CD14+ monocytes infected with different *Leishmania* isolates. Results are expressed as scatterplots, with each point representing an individual donor, showing statistically significant difference ($p \leq 0.05$) and R^2 value between different strains. Correlation analyses were performed using Pearson's correlation coefficient ($n=6$ donors). A) Positive correlation between TLR2⁺/TNF- α ⁺ and TLR9⁺/TNF- α ⁺ CD14- monocytes infected with *L. braziliensis*. B) Positive correlation between TLR2⁺/TNF- α ⁺ in CD14+ monocytes infected with the different *Leishmania* isolates.

Table 1. Comparison of the intensity of expression of the activation-related molecules TLR2, TLR9, HLA-DR, CD80 and CD86 between CD14+ and CD14- monocytes.

MFI	<i>L.b.</i> 2904		<i>L.c.</i> wild		<i>L.c.</i> BH46	
	CD14-	CD14+	CD14-	CD14+	CD14-	CD14+
TLR-2	139.2±27.4 ^c	159.3±30.1 ^c	73.4±5.5 ^d	90.3±13.6 ^d	99.9±9.1	106.4±11.2
TLR-9	178.4±25.1 ^e	197.4±30.6 ^e	101.4±9.1 ^f	131.7±34.3 ^f	130.7±16.9 ^g	141.1±11.7 ^g
HLA-DR	84.3±14.8 ^h	99.7±23.7 ^h	42.9±15.4	46.0±11.4	41.09±10.9 ⁱ	63.1±17.7 ⁱ
CD86	205.5±37.3 ^j	169.5±22.8 ^j	72.6±10.7 ^k	102.8±22.4	136.7±62.2 ^l	203.3±80.3 ^l
CD80	27.9±1.7	40.1±26.9	33.1±6.7 ^m	56.8±20.0 ^m	80.5±7.8	65.9±13.5
% TNF	36.8±9.2	32.8±8.9	20.1±9.6	30.6±10.2	9.2±6.3	5.2±2.3
% IL10	3.4±1.1	4.1±1.0	3.9±2.5	5.9±2.9	4.6±2.7	2.4±1.1

* Comparisons were performed between the different subpopulations infected with the same isolate of *Leishmania*. Results are expressed as mean ± standard deviation (n=6). Equal letters represent statistically significant (p≤0.05) differences in monocytes infected with the same strain.

Figure 1

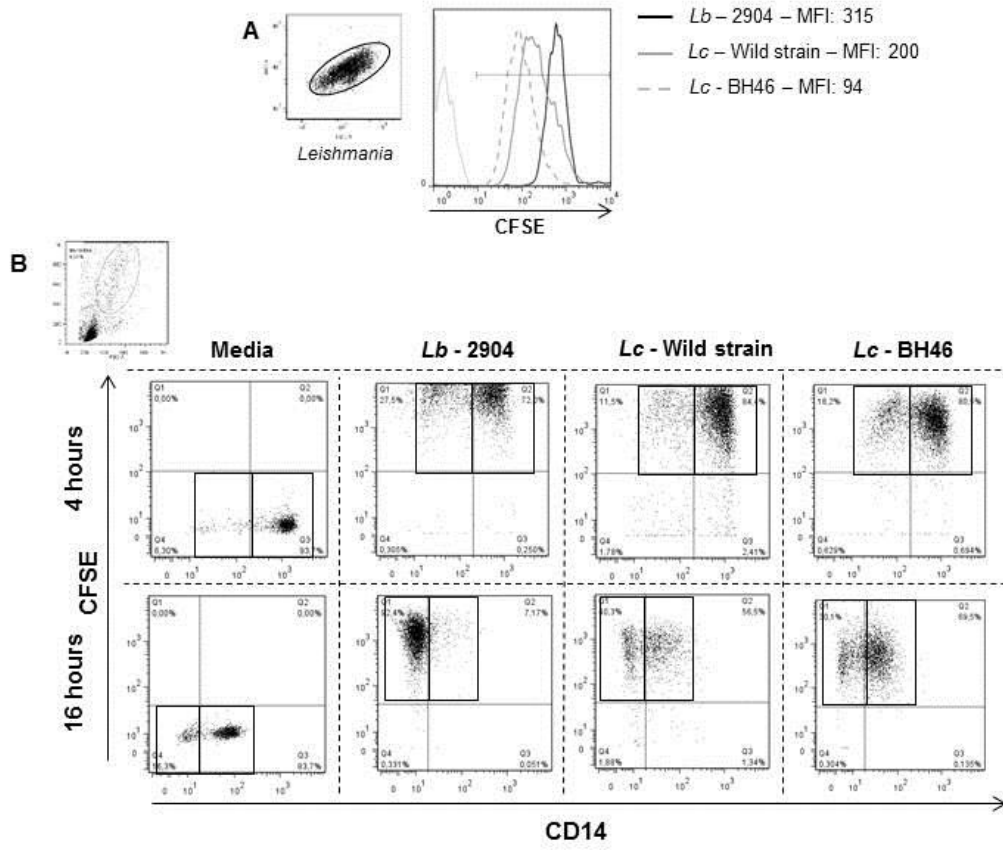


Figure 2

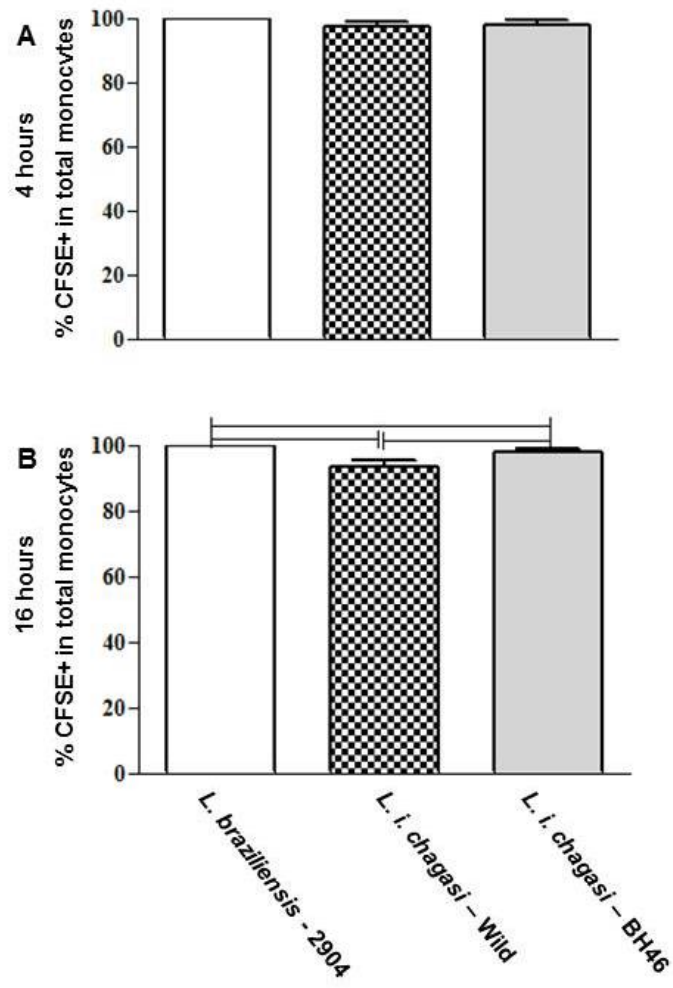


Figure 3

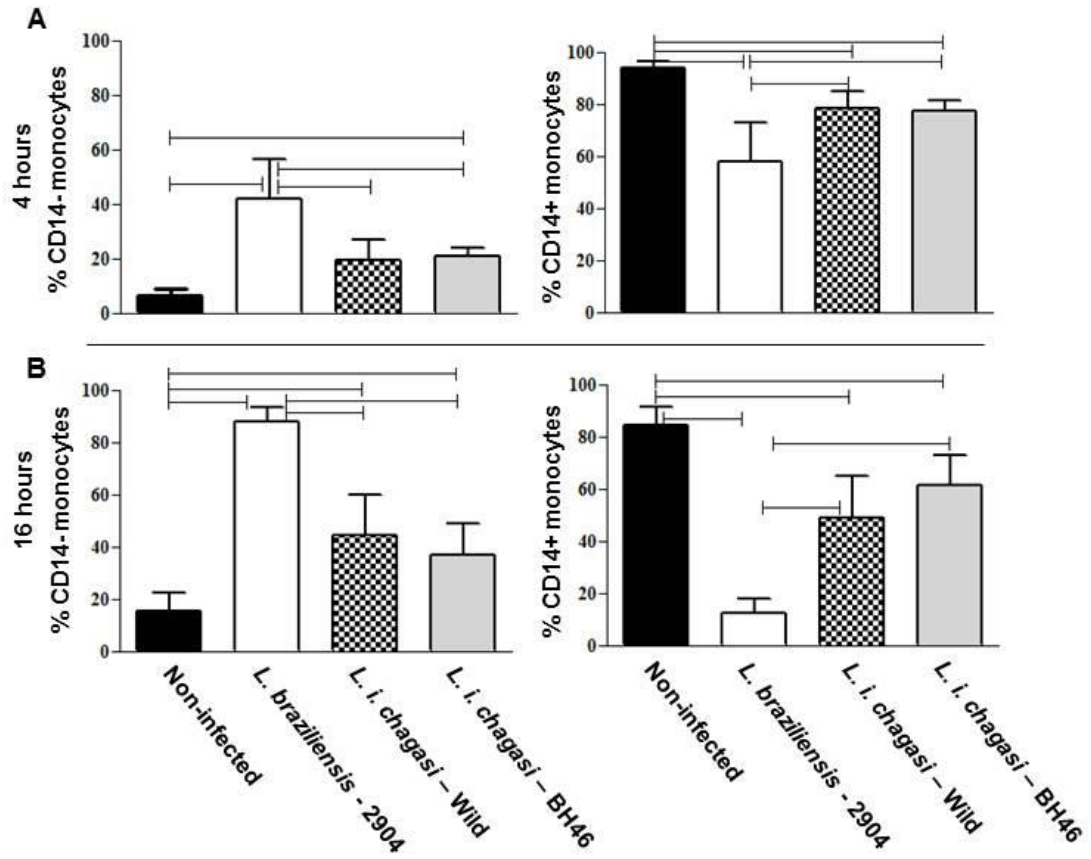


Figure 4

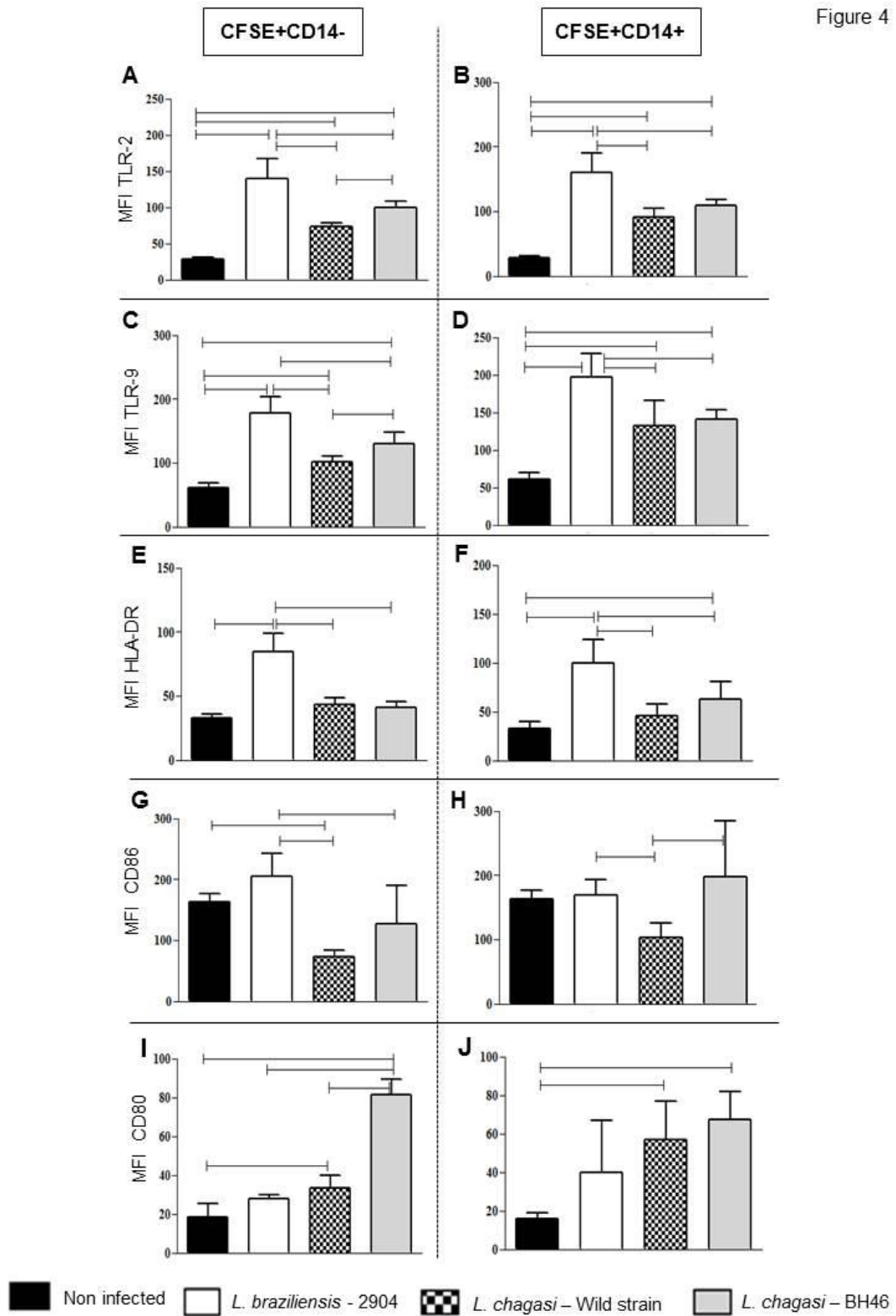


Figure 5

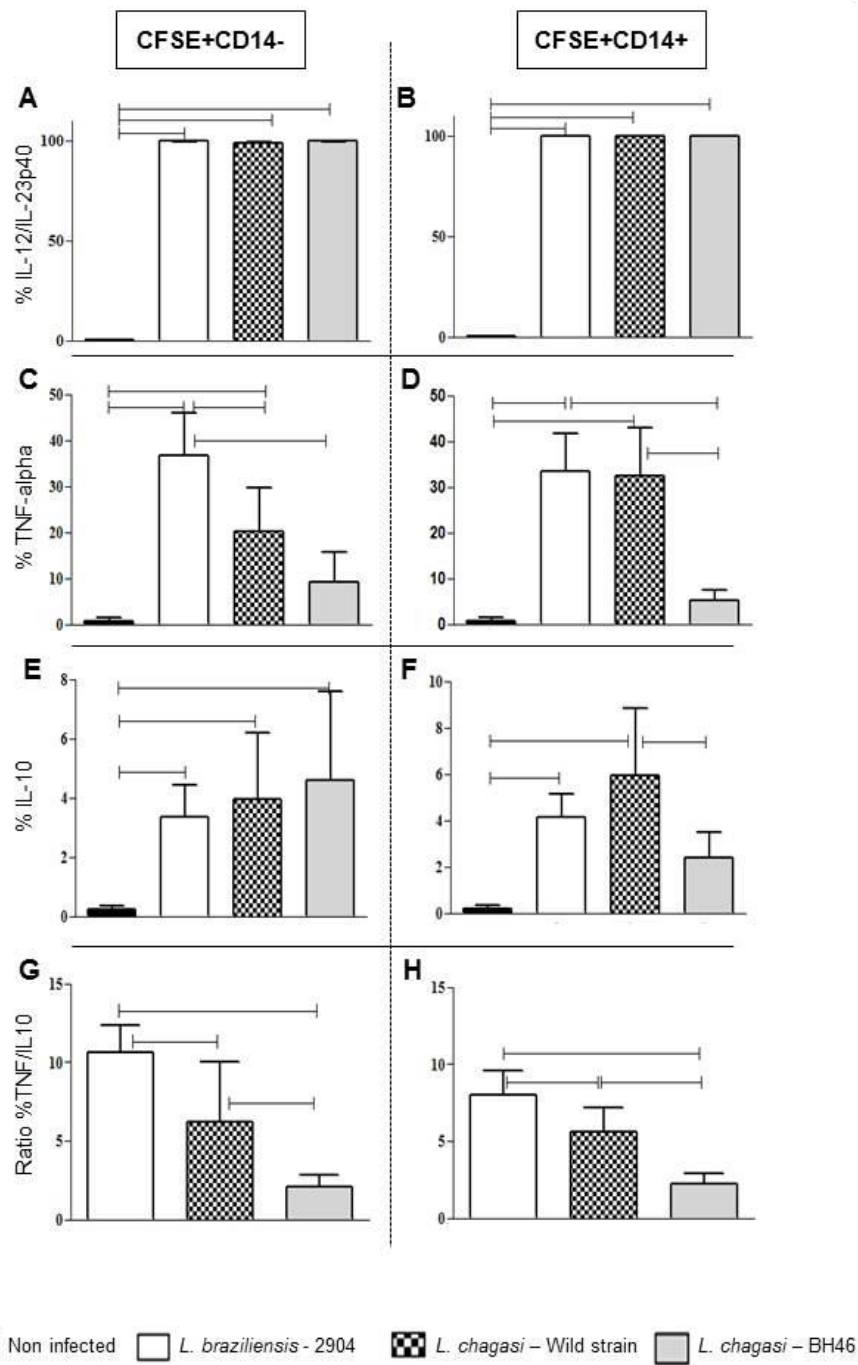
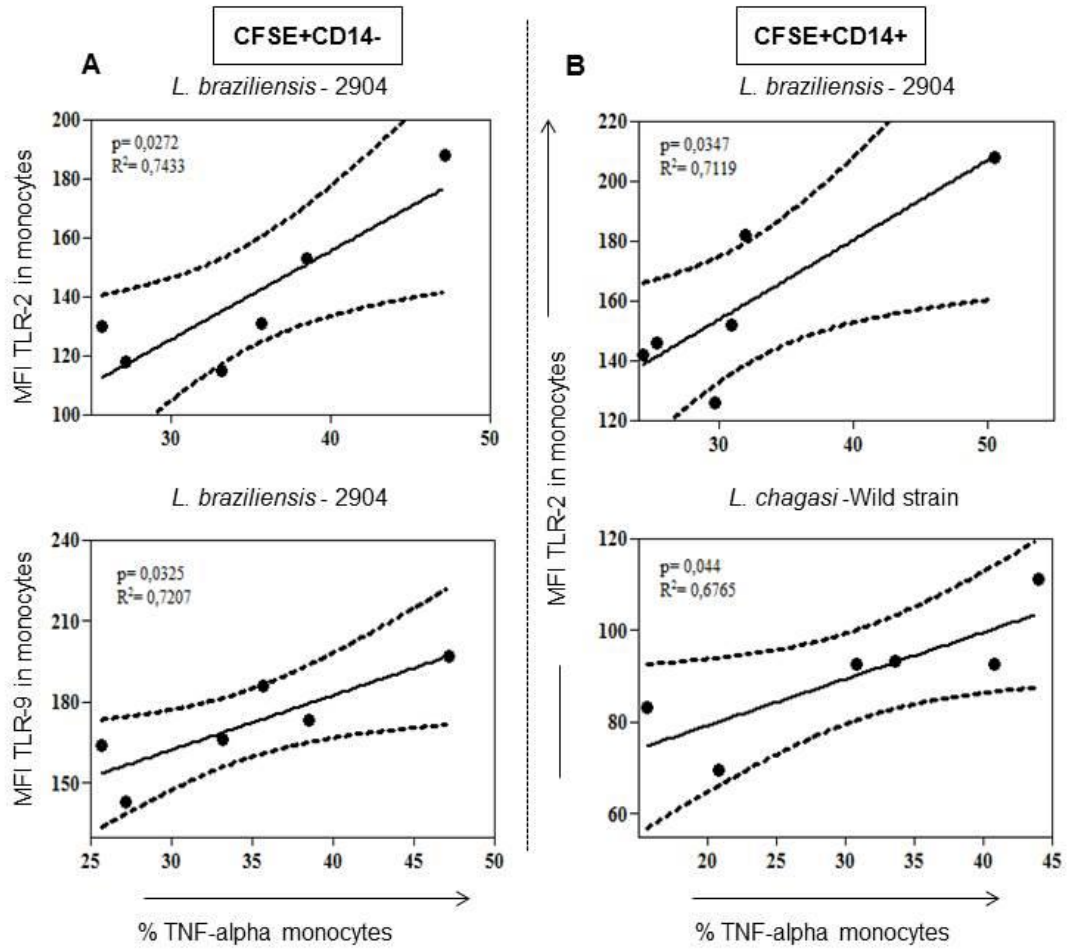


Figure 6



Review Article

Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection

K. J. GOLLOB,^{1,2} A. G. VIANA³ & W. O. DUTRA^{2,3}

¹Graduate Program in Medicine and Biomedicine, Institute for Education and Research, Hospital Santa Casa, Belo Horizonte, MG, Brazil, ²National Institute for Science and Technology – Tropical Diseases (INCT-DT), Belo Horizonte, MG, Brazil, ³Laboratory of Biology of Cellular Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

SUMMARY

Leishmaniasis covers a broad spectrum of diseases with distinct, and sometimes overlapping, characteristics. The common thread in all forms of leishmaniasis is the infection by the parasite Leishmania belonging to the genus Leishmania. Upon infection of humans, there can be at least three outcomes, (i) control of Leishmania by the host immune response resulting in asymptomatic disease, (ii) patent infection and development of a relatively mild form of leishmaniasis and (iii) patent infection and development of severe clinical forms. The factors that determine the outcome of an initial inoculation with Leishmania are many, with the species of Leishmania representing one of the strongest predictive factors for the development of a given clinical form of disease. This is seen with L. braziliensis and L. amazonensis, infection leading mostly to tegumentary forms of disease, and L. infantum with the potential to induce visceral disease. However, it is also clear that the host immune response is a key factor in disease progression, not only responsible for control of Leishmania, but also playing an important role in disease progression and pathology. This duality between protective and pathogenic immune responses in individuals infected with Leishmania in the Americas is the focus of this review.

Keywords CD4 T lymphocytes, cytokine, human, immunopathology, immunoregulation, leishmaniasis

Correspondence: Kenneth J. Gollob, Instituto de Ensino e Pesquisa, Programa de Pós-Graduação em Biomedicina e Medicina, Hospital Santa Casa, Rua Domingos Vieira N° 590, Belo Horizonte, MG 30150-240, Brazil (e-mail: kjpgollob@gmail.com).

Disclosures: None.

Received: 8 October 2013

Accepted for publication: 22 January 2014

INITIAL HOST–PARASITE INTERACTION: DISEASE DEVELOPMENT VS. ASYMPTOMATIC EXPOSURE

Natural infection via a *Leishmania* contaminated sand-fly bite can lead to asymptomatic exposure or development of severe leishmaniasis in humans (1, 2). This first decision point holds for infection with species that eventually lead to either tegumentary or visceral disease (1). Upon natural infection, *Leishmania* metacyclic promastigotes gain access to the host where they encounter neutrophils, macrophages and monocytes, all of which can serve as targets for infection (2–5). It has become clear over the years that all three cell types can be infected by *Leishmania* and that the proportion of each cell type infected, the microenvironment present at the site of infection, the activation state of the cells and the intensity of infection all culminate in the development of a productive *Leishmania* infection, or possibly extinguish *Leishmania* before it progresses to a patent infection (Figure 1). Upon infection of host cells, *Leishmania* is likely shuttled to the nearest draining lymph nodes where again, depending on the microenvironment and cell types most involved, further replication and dissemination of the infection can occur, as well as the development of the adaptive immune response made up of B and T cells (CD4, CD8, double negative) (1, 2). Thus, these stages are the earliest events that determine whether an initial inoculation with *Leishmania* will go on to form a patent infection, or be halted at this early stage.

Interaction between *Leishmania* and a number of potential surface receptors expressed by host neutrophils, dendritic cells, macrophages and monocytes trigger phagocytic activities, allowing *Leishmania* to gain access into these cells (6–11). It was recently shown that infection of neutrophils can lead to *Leishmania* death, but also to

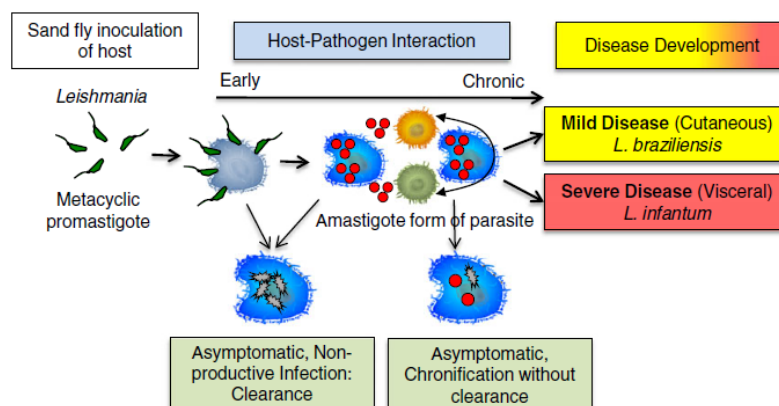


Figure 1 Parasite species and host responses influence disease outcome. *Leishmania* infects macrophages early during infection: (i) infection via the introduction of infective metacyclic promastigotes via an insect bite, (ii) initial infection of host macrophages, (iii) conversion to intracellular replicating form of the parasite (amastigote) and (iv) progression to a complex host–parasite interaction culminating in diseases with distinct clinical forms.

the generation of apoptotic bodies that are capable of inhibiting effective responses of nearby macrophages (4). This initial contact can influence the replication of *Leishmania* in the critical early phases of infection. If macrophages are infected, there are also a variety of responses that can be triggered depending on the macrophage activation state and the species of *Leishmania* (2, 12–15). In addition to controlling parasite replication or not, the macrophage can also produce highly active immunoregulatory cytokines, such as the inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 and the down-modulatory cytokines, TGF- β and IL-10 (2, 12, 16–20). Again, which cytokines and biological activities expressed by the infected macrophage depend on the activation state of the cell, the *Leishmania* species or strain, the sand-fly vector saliva activities present and host genetics (1, 2, 21). Recent studies have shown that strain differences within the same species are associated with a given clinical form of disease (22, 23). Several studies have shown the importance of host genetic make-up in susceptibility to tegumentary and visceral forms of leishmaniasis (2, 24–30). These host genetic differences can play important roles in determining whether an individual will induce an effective leishmanicidal response or not, as well as determine the further development of disease and pathology. Many gene polymorphisms identified as susceptibility factors for leishmaniasis are in genes that code for molecules associated with the immune response, especially cytokines and HLA alleles (25, 28, 31). One can postulate, for example, (32) that an individual with a high producer allele for TNF- α could be primed to respond more effectively with leishmanicidal activity of infected macrophages early following infection. However, if the initial infection is not controlled, that same high production of TNF- α could later

contribute to more severe immunopathology development as seen in mucosal leishmaniasis (30, 33–35).

Interestingly, different monocyte and macrophage profiles have been associated with distinct clinical forms of leishmaniasis. The majority of the studies have been performed when an active adaptive immune response is already induced in the infected individual and, thus, the host monocytes and macrophages are already in an environment dominated by inflammatory cytokines and active CD4+ T cells, DN T cells and CD8+ T cells, all producing bioactive cytokines and chemokines (2, 36–38). Nevertheless, clear differences are seen in monocytes and macrophages isolated from patients with leishmaniasis as compared to noninfected controls and comparing between clinical forms of disease (39–41).

Thus, the initial *Leishmania*–host interaction culminates in either the control, with or without sterilization, of *Leishmania* likely leading to an asymptomatic nonproductive infection, or it leads to a patent *Leishmania* infection expressed as either tegumentary diseases, such as cutaneous, mucosal or disseminated clinical forms (associated with *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana* and others in the Americas) of leishmaniasis, or visceral disease (*L. infantum chagasi* in the Americas) (Figure 1).

PATHOGEN CONTROL VS. PATHOLOGY: IMMUNE BALANCING ACT IN HUMAN LEISHMANIASIS

Tegumentary disease

Once an adaptive cellular immune response develops following the presentation of classic peptide antigens by

MHC class I for CD8+ T cells, MHC class II for CD4+ T cells and CD1-presented lipid antigens to DN T cells and invariant NK T cells (iNK T cells), the balance between control of the pathogen and pathology development is amplified (1, 2, 33, 36, 42). The initial expansion of T cell subpopulations with distinct functional potentials begins in earnest within the draining lymph nodes following the initial infection (Figure 2). There, T cells differentiate towards effector T cells following activation through their interaction with antigen-presenting cells (APCs). These differentiated T cells, capable of producing distinct cytokines, can home to infection sites and drive efficient anti-*Leishmania* immune responses (Figure 2) both at the lesion site and in draining lymph nodes. These responses are greatly driven by Th1 CD4+ T cells producing monocyte and macrophage-activating cytokines like IFN-gamma and TNF-alpha, together with regulatory cytokines like IL-10 (1, 2, 38). Importantly, the balance begins between controlling *Leishmania* replication within infected macrophages and monocytes, and the induction of immunopathology by excessive inflammatory responses (33, 35, 42–44). Activated Th1 cytokine producing CD4+ T cells have been correlated both with effective leishmanicidal immune responses, as well as with greater pathology in cutaneous disease (35,45), and in mucosal disease, where an exacerbated Th1-type CD4+ T cell response is present (32–34, 46–49). Moreover, CD4+ T cells expressing the

TCR V beta region, Vbeta5, have been associated with lesion size and differential lesion homing, indicating the possible role of these cells in pathology (44). In addition, the strong inflammatory CD4+ T cell response seen in cutaneous leishmaniasis (CL) is accompanied by increased IL-10 producing T cells (43), and the same is seen within the monocyte population (32). Thus, an ongoing regulation of the inflammatory response in CL disease is apparent, while that same co-regulation is faulty in mucosal leishmaniasis (ML) (32). Interestingly, while TNF-alpha and IFN-gamma are associated with the eventual resolution of disease in CL, lower levels of these cytokines are associated with disseminated leishmaniasis, indicating a weak cell-mediated T cell response and thus, poor control of *Leishmania*, but also a lack of tissue destruction as seen in cutaneous and mucosal disease (50–52), both of which are associated with higher levels of TNF-alpha and IFN-gamma. Moreover, monitoring CD4+ T cell activation and cytokine production during active disease and following disease resolution has indicated their important role in finalization of disease and pathology (49, 53, 54). Recently, a correlation between IL-17 production and tegumentary and mucosal disease was found (46, 55). Thus, the nature of the CD4+ T cell response during active CL and through disease resolution is associated with robust production of inflammatory cytokines such as TNF-alpha and IFN-gamma in the presence of IL-10, a regulatory

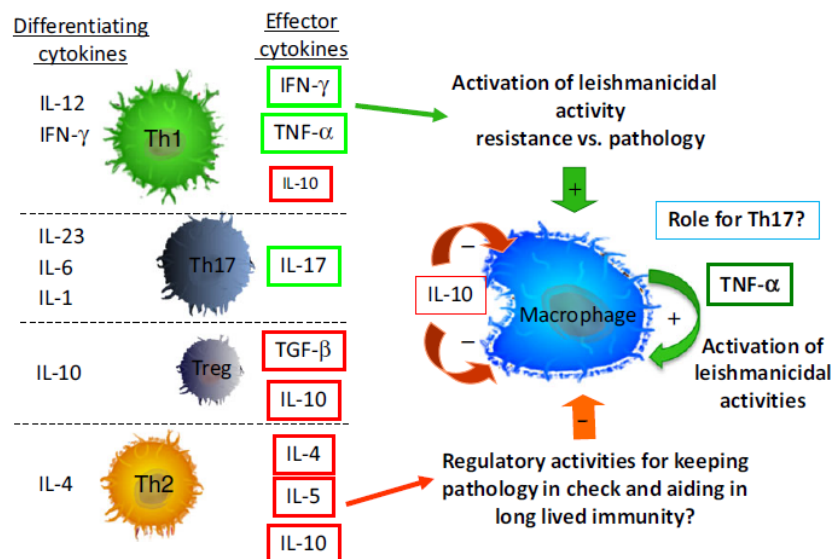


Figure 2 T cell subsets and macrophage interactions in cellular responses to *Leishmania*. Effective cellular responses to combat *Leishmania* depend on the formation of CD4+ T cell subsets that are capable of activating leishmanicidal responses by host macrophages and monocytes. The differentiation of CD4+ T cell subsets, Th1, Th2, Th3, Treg and Th17 all depend greatly on the cytokine microenvironment during the initial activation of naïve CD4+ T cells. Depending on the balance of these cytokines, co-stimulatory molecules, host genetics and antigenic stimuli, a given T cell will differentiate towards one of the Th subsets and produce the effector cytokines indicated in the figure. These cytokines in turn will act on host macrophages and monocytes to prime them for effective or ineffective control of *Leishmania* and subsequent control or not of immunopathology as well.

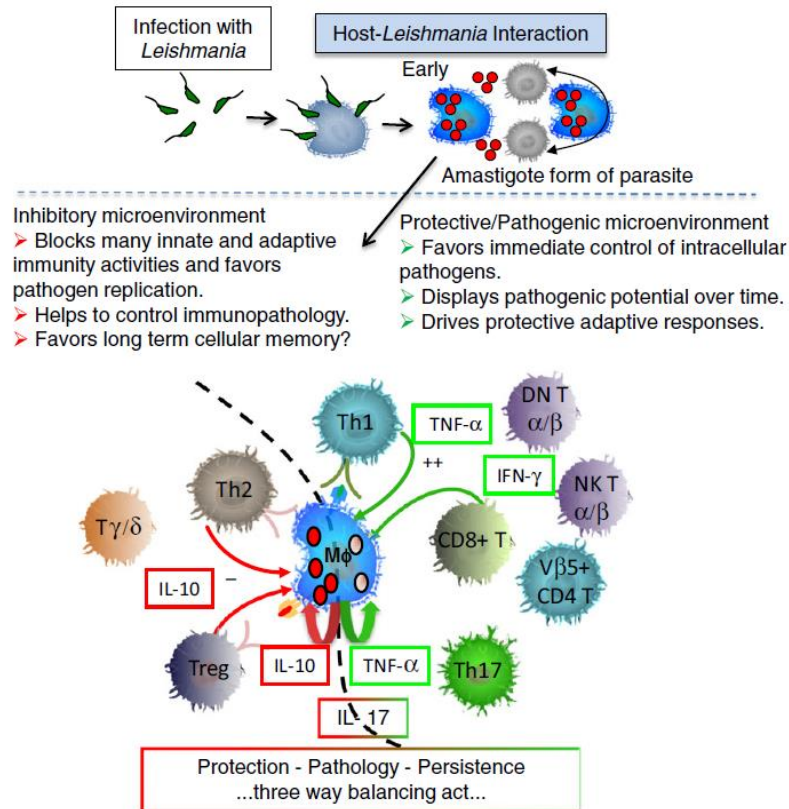


Figure 3 Protection – Pathology – Persistence, three-way balancing act. After the initial introduction of the pathogen within the host, the infective form of the parasite quickly parasitizes host macrophages and converts to the amastigote, intracellular replicating form of the parasite. This initial interaction between the host and parasite is paramount for establishing the infection and directing the subsequent adaptive immune response. Both parasite and host factors interact to culminate in a beneficial or detrimental host–parasite interaction, which is dependent on multiple factors. However, it is clear that the macrophage itself will be more effective at killing *Leishmania* under a cytokine environment rich in IFN-gamma and TNF-alpha and that IL-10 can act to reduce macrophage production of TNF-alpha and parasite killing.

cytokine that acts to reduce production of TNF-alpha by host macrophages and monocytes (Figure 3) (43). Interestingly, treatment of leishmaniasis patients with pentoxifylline to reduce the activity of TNF-alpha leads to quicker resolution of lesions in both CL and ML (56–60). These groups of studies, and others not cited here, have produced a model of the role of CD4+ T cells in orchestrating the initial leishmanicidal response, but also for contributing to lesion development in both cutaneous and mucosal disease (Figure 3).

In addition to classic CD4+ T cells producing key regulatory cytokines for induction of leishmanicidal responses, CD8+ T cells also play a role in both the establishment of the cytokine environment, as well as in cytolytic activity (2, 33). Several studies have shown that CD8+ T cells are associated with both protective immunity in CL, as well as greater pathology in CL and ML (61–65). In addition to cytokine production, which is lower in both frequency and

intensity as compared to the CD4+ T cell subpopulation, CD8+ T cells also express cytolytic molecules such as granzyme and perforin. Progression of CL lesion has been associated with an increased frequency of CD8+ T cells expressing granzyme (63). Thus, the role of CD8+ T cells in both control of *Leishmania* and in lesion pathology is likely important.

Finally, a minority subpopulation of highly activated, cytokine-producing T cells identified by their lack of both CD4 and CD8 co-receptors, termed double-negative (DN) T cells, were shown to be the second most prevalent producers of inflammatory cytokines in active CL (38). This DN T cell population is a heterogeneous population made up of T cells that recognize antigens presented by classic MHC molecules, class I and class II, as well as by non-classical presenting molecules, CD1. CD1 molecules have an antigen-binding cleft that is shallow and better suited for presentation of lipid and carbohydrate antigens than

peptide antigens (66, 67). However, despite this heterogeneity, the DN T cell subpopulation is greatly committed towards the production of inflammatory cytokines (TNF-alpha and IFN-gamma) and, when subdivided into those T cells expressing the alpha/beta T cell receptor (TCR) vs. those expressing the gamma/delta TCR, one can see a clear division into T cell populations that produce a biased inflammatory environment (alpha/beta DN T cells) vs. those that produce a biased regulatory environment (gamma/delta DN T cells) (37). Thus, these T cell subpopulations may carry out distinct roles in parasite control vs. control of pathology in human CL.

Overall, a picture of the duality of the T cell response on the broad view of *Leishmania* control vs. the development of pathology has been identified for the majority of T cell subpopulations studies in human CL and ML. This duality represents a classic immunological concept now clearly demonstrated in a complex human parasitic disease (Figure 3). The ability of immunotherapies to modulate these responses is the key towards development of novel treatments that can accelerate healing and possibly reduce the toxicity of existing treatments by providing immune therapies that could serve as treatment adjuvants with existing therapies. Such treatment has been demonstrated effective by the use of pentoxifylline to reduce pathology and speed healing during CL and ML (56–60). In addition, the use of immune modulating compounds such as n-acetyl-l-cysteine may act in conjunction with glucantime to produce more effective leishmanicidal responses while regulating some of the immunopathology induced during infection (68, 69). Further studies are needed to determine the suitability of this approach in human disease.

Visceral disease

Visceral leishmaniasis (VL) presents a case of a misbalanced immune response, but unlike in CL and ML where a strong inflammatory and leishmanicidal response is poorly controlled leading to the formation of excessive immunopathology, VL is the result of an ineffective leishmanicidal immune response. This defect leads to the dissemination of *Leishmania* in the host and a generalized immune disbalance dominated by increases in down-modulatory cytokines such as IL-10 and TGF-beta, both of which dampen the effectiveness of the cellular anti-*Leishmania* response (Figure 4). The reasons why VL can develop following infection with *L. infantum* in the Americas, while typically not following infection with *L. amazonensis* or *L. braziliensis*, for example, are many fold and include the initial host–parasite interaction, temperature sensitivity of the parasite, the host immune response under the influence of host genetics and past immune experience, and even the

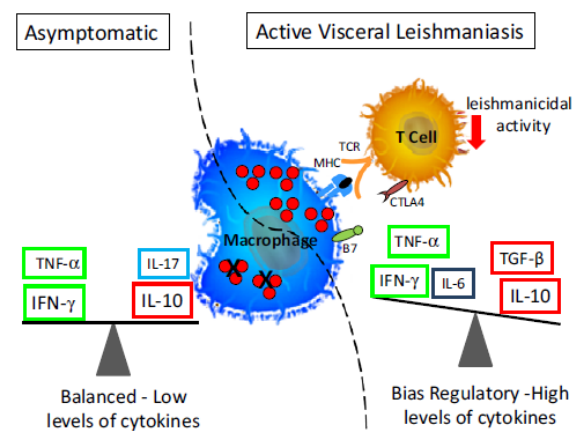


Figure 4 Representation of the two clinical outcomes following infection with *Leishmania infantum*. While an asymptomatic outcome is associated with lower levels cytokine production and a balance between the cytokines IFN-gamma and IL-10, patients with active visceral leishmaniasis (VL) are associated with higher production of both inflammatory (IFN-gamma and TNF-alpha) and the down-regulatory cytokine IL-10. Thus, a suppression of an effective leishmanicidal response in VL is correlated with disease development, as well as the presence of immunomodulatory molecules such as CTLA-4 leading to ineffective control of *Leishmania*.

sand-fly–host interaction. Thus, the outcome of an estimated 5% of infections with *L. infantum* is VL, which culminates in the dissemination of *Leishmania* throughout the body concentrating within macrophages and monocytes in the bone marrow, liver and spleen (1, 2, 70).

The immune response in individuals following infection with *L. infantum* can be effective in controlling infection and generating a strong delayed type hypersensitivity response. In these cases, the infected individual is typically asymptomatic and the strong DTH is associated with high levels of IFN-gamma and TNF-alpha produced by CD4+ T cells (70, 71). IFN-gamma is an important cytokine involved with resistance of infection in VL due to its capacity to induce the production of ROS in phagocytic cells, which lead to destruction of the parasite (72).

Evaluation of cytokine levels in active VL caused by *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* have shown high levels of IFN-gamma in serum (73) and plasma (74–76). However, it is believed that despite the presence of high levels of IFN-gamma during infection, the host may fail to control *Leishmania* and mount an effective response to kill the parasite, partly due to an IFN-gamma receptor blockage in macrophage signalling (74). Other researchers have found a mixed profile of cytokines during active VL, associated with high levels of IFN-gamma, IL-10 and IL-6, demonstrating an exacerbation

in immune response in these patients (74, 76). Following treatment, patients with VL show a reduction in these cytokines and eventually return to levels similar to those observed in healthy individuals (74, 75). Another inflammatory cytokine associated with active VL is TNF-alpha (77). This cytokine seems to play an important role in disease progression (77). IL-6, while at high levels during active VL before treatment (74, 75), also remains significantly elevated compared with control individuals even after treatment, indicating that it may have some beneficial role in disease resolution (74). Despite the high levels of inflammatory cytokines, increased levels of IL-10 in serum from active patients with VL have been associated with severity of VL (75, 78–81) (Figure 4). Several articles have shown the importance of IL-10 in the pathogenesis of VL (82–84). Gautam *et al.* have shown that IL-10 is related to the chronicity of infection, suggesting a direct decrease in T cell activation and/or an inhibitory effect directly on APC. These studies demonstrated that blocking IL-10 in cultures of splenic aspirates from patients with VL led to a decrease in the parasite load (83). Thus, it is believed that IL-10 plays an important role in the suppression of the immune response and thus is an important therapeutic target in VL (83, 84). TGF-beta also seems to be important in the development of VL, given its association with high levels of IL-10 in active VL (85).

Deciphering the mechanisms involved in the regulation of cytokine production during active VL infection as compared to asymptomatic individuals will contribute to a better understanding of the immunological phenomena that occur during disease progression. Immune responses among individuals with the subclinical form of VL have shown variable cytokine profiles, predominantly characterized by low levels of IL-10 (76, 77, 86), IL-12 and IFN-gamma (77), suggesting an important role for these cytokines in disease development (86). A follow-up study of patients with active and subclinical disease showed that the levels of IL-10 and TNF-alpha were higher in the acute form of the disease than in subclinical individuals (77). These studies suggest that production of both resistance and susceptibility cytokines may be important for contributing to distinct clinical manifestations (86). Although in recent years, research has intensified concerning the role of the cytokine IL-17 in protozoa infection, very little is known about its activities in VL. Studies have indicated that IL-17 may be involved in the pathogenesis of CL (87, 88). Interestingly, the opposite is suggested in Chagas' disease, given the association of IL-17 expression with the occurrence of the indeterminate (asymptomatic) clinical form (89). Studies seeking to understand the importance of Th1, Th2 and Th17 responses in

Leishmania donovani-induced VL have found that individuals who did not develop kala-azar (KA), or who were protected against KA during a severe outbreak, produced higher levels of IL-17 and Th1 cytokines than those with active KA, suggesting their role in protection from KA (90).

Effective T cell immunity requires activation and differentiation of T cell subpopulations into active effector cells. This activation and differentiation depends on efficient antigen presentation, as well as co-stimulatory activation via molecules like CD28, which is balanced by inhibitory networks such as those provided by CTLA-4 (91), PD1 and PD1-L (92). Through the analysis of markers associated with anergy/exhaustion in CD8+ T cells, it was demonstrated that VL subjects before treatment had higher expression of CTLA-4 and PD-1, than after treatment, or as compared to control individuals (93). These authors went on to suggest that this inhibitory network limits the ability of the individuals to produce IFN-gamma and effectively combat *Leishmania* (93). In experimental models of VL, blockade of CTLA-4 can result in enhanced host resistance to intracellular pathogens. The administration of monoclonal antibodies anti-CTLA-4 in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani* enhanced the frequency of IFN-gamma and IL-4 producing cells in both spleen and liver and thus indicated a potent immunomodulatory activity of CTLA-4 *in vivo* (94). CTLA-4 suppression is important because of its capacity to mediate TGF-beta production. However, higher production is critically involved in intracellular parasite replication (95). Finally, given CTLA-4's role in maintenance of T cell homeostasis, it seems clear that more research on this molecule's role in human VL is warranted (95).

The programmed death 1 (PD-1) receptor: PD ligand (PD-L) pathway is another major receptor–ligand network that functions primarily to provide an inhibitory signal. The inhibitory receptor PD-1 and its ligand PD-L (B7H1) have been shown to play an important role in T cell regulation (96). Joshi *et al.* demonstrated the importance of CD8+ T cells in the control of *Leishmania* infection in animal models where CD8+ T cells produce cytokines like IFN-gamma that may aid in parasite killing. However, the PD-1/PD-L interaction seems to induce apoptosis and inhibit proliferation of CD8+ T cells and thereby reduce *Leishmania* control as seen by recovering T cell activity upon blocking the PD-1/PD-L interaction (96). Figure 4 summarizes the results found above in patients during active VL as compared to the asymptomatic infections.

Several studies have shown the importance of immunoregulatory cytokines described above in experimental mouse models of visceral leishmaniasis and some are discussed briefly in Box 1.

Box 1: Experimental murine models of visceral leishmaniasis

To better understand the role of immunoregulation and immunopathology in VL induced following infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania chagasi/infantum*, experimental mouse models have been extensively studied. A study evaluating the immune response in BALB/c mice with an inoculum of different concentrations of *L. chagasi* showed that those mice infected with low doses seemed to respond with the production of IFN-gamma. However, when higher doses were administered the type of immune response changed and IL-10 prevailed, together with progression of severe disease indicating the importance of immunoregulatory cytokines in disease development in this model (97). The importance of IFN-gamma in macrophage activation and *Leishmania* killing has been studied in BALB/c IFN-gamma knockout mice and highlighted a fundamental role for this cytokine in disease resistance (98). Finally, mice deficient in TNF-alpha have increased susceptibility to hepatic *L. donovani* infection (99, 100).

Studies using mice lacking the gene for IL-10 showed that this cytokine plays a central role in susceptibility to *L. donovani* infection. In the absence of IL-10, mice rapidly developed an enhanced Th1-type response. The consequence of this response is a highly effective control of visceral parasites (101, 102). Experiments blocking IL-10-receptor or using anti-IL-10 monoclonal antibodies showed that the immune response and the production of higher levels of IFN-gamma could be restored, which led to activation of macrophages, and consequently parasite death (102–105). Interestingly, IL-6 knockout mice infected with *L. donovani* had better control of *Leishmania* in the liver and higher IFN-gamma production with effective granuloma formation, thus suggesting that IL-6 played a role in pathology in this model (106). Experiments using anti-TGF-beta mAb did not demonstrate significant effects on IFN-gamma levels, showing that the ability to modulate IFN-gamma levels is clearly a hallmark of IL-10 activity (107, 108).

PATHOLOGY RESOLUTION AND PROTECTION: ROLE OF MEMORY AND PATHOGEN PERSISTENCE

Once active leishmaniasis is diagnosed treatment typically begins within a week or so after the initial diagnosis, or sooner depending on the clinical form and patient complications (co-infections, other diseases, etc.). Most studies of disease resolution have been performed before and after treatment, with a few during treatment. Many factors determine an individual's response to treatment and disease resolution. As stated above, the adaptive immune response plays important roles in both parasite control and development of pathology. Studies in animal models have suggested that sterilizing immune responses early after infection with *Leishmania* can lead to poor maintenance of memory responses (109). In addition, the development and maintenance of effector memory vs. central memory T cell populations can be influenced by the continuing presence of *Leishmania*, even after disease resolution, and in the absence of parasite (110, 111). In human disease, we know that *Leishmania* often persists in chronic infection and is held at bay due to the active immune response controlling further replication and expansion of *Leishmania in vivo*. This is most clearly seen in cases of immunosuppression via chemical means or naturally due to HIV infection. In active CL disease, there is often long-lived immunity following disease resolution, and this

immunity is most likely related to maintenance of *Leishmania* within the host in the form of a cryptic infection (109). Thus, for any effective vaccine against *Leishmania*, the ability to induce a long-lived protective response in the absence of live persistent parasites is a key hurdle to be solved.

CONCLUDING REMARKS

Overall, it has been clear during the study of human and animal leishmaniasis that the immune response not only plays a key role in control of the parasite, but also in the development of pathology. While this review has focused on ATL and only briefly referred to studies on leishmaniasis in the Old World, there are many parallels between CL due to *L. major* infection. Moreover, visceral leishmaniasis in the Americas also has similar immunoregulatory aspects with KA. Thus, through continued studies designed to understand the immunological aspects of leishmaniasis, these findings will continue to aid in the development and discovery of novel therapies, vaccines and diagnostics.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our work related to this review was supported by NIH/Tropical Medicine Research Center Program, NIH-NIAID (R03AI066253-03), INCT-DT/CNPq and FAP-EMIG. We would like to thank all authors whose

contributions have allowed for a greater understanding of the pathogenesis of human leishmaniasis and apologize to

others whose work was not cited here due to size and format limitations.

REFERENCES

- Murray HW, Berman JD, Davies CR & Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; **366**: 1561–1577.
- Kaye P & Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 2011; **9**: 604–615.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, et al. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 2008; **321**: 970–974.
- Afonso L, Borges VM, Cruz H, et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol* 2008; **84**: 389–396.
- Novais FO, Santiago RC, Bafica A, et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol* 2009; **183**: 8088–8098.
- Brandonisio O, Spinelli R & Pepe M. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes Infect* 2004; **6**: 1402–1409.
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD & Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 901–944.
- Ueno N, Bratt CL, Rodriguez NE & Wilson ME. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum* chagasi promastigotes. *Cell Microbiol* 2009; **11**: 1827–1841.
- Chakraborty P, Ghosh D & Basu MK. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. *J Parasitol* 2001; **87**: 1023–1027.
- Saraiva EM, Andrade AF & de Souza W. Involvement of the macrophage mannose-6-phosphate receptor in the recognition of *Leishmania mexicana* amazonensis. *Parasitol Res* 1987; **73**: 411–416.
- Mosser DM, Vlassara H, Edelson PJ & Cerami A. *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *J Exp Med* 1987; **165**: 140–145.
- Raes G, Beschin A, Ghassabeh GH & De Baetselier P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**: 454–459.
- Mosser DM & Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 958–969.
- Hsiao CH, Ueno N, Shao JQ, et al. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. *Microbes Infect* 2011; **13**: 1033–1044.
- De Almeida MC, Cardoso SA & Barral-Netto M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *Int J Parasitol* 2003; **33**: 153–162.
- Rodriguez NE, Chang HK & Wilson ME. Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Infect Immun* 2004; **72**: 2111–2122.
- Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania* major infection. *J Immunol* 2004; **172**: 4454–4462.
- Fromm PD, Kling J, Mack M, Sedgwick JD & Korner H. Loss of TNF signaling facilitates the development of a novel Ly-6C(low) macrophage population permissive for *Leishmania* major infection. *J Immunol* 2012; **188**: 6258–6266.
- 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.
- Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, et al. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol* 2003; **170**: 2613–2620.
- Costa DJ, Favali C, Clarencio J, et al. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun* 2004; **72**: 1298–1305.
- Queiroz A, Sousa R, Heine C, et al. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 4028–4034.
- Schriefer A, Guimaraes LH, Machado PR, et al. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis* 2009; **15**: 871–876.
- Ettinger NA, Duggal P, Braz RF, et al. Genetic admixture in Brazilians exposed to infection with *Leishmania chagasi*. *Ann Hum Genet* 2009; **73**: 304–313.
- Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol* 2009; **31**: 254–266.
- Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, et al. 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.
- Peacock CS, Collins A, Shaw MA, et al. Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Genet Epidemiol* 2001; **20**: 383–396.
- Fakiola M, Strange A, Cordell HJ, et al. Common variants in the HLA-DRB1-HLA-DQA1 HLA class II region are associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. *Nat Genet* 2013; **45**: 208–213.
- Ramasawmy R, Menezes E, Magalhaes A, et al. The -2518 bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol* 2010; **10**: 607–613.
- Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis* 2006; **194**: 519–527.
- Sakthianandeswaren A, Foote SJ & Handman E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2009; **25**: 383–391.
- Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol* 2006; **63**: 70–78.
- Dutra WO, de Faria DR, Lima Machado PR, et al. Immunoregulatory and effector activities in human cutaneous and mucosal leishmaniasis: understanding mechanisms of pathology. *Drug Dev Res* 2011; **72**: 430–436.
- Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 2002; **70**: 6734–6740.
- Oliveira F, Bafica A, Rosato AB, et al. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2011; **85**: 70–73.
- Gollob KJ, Antonelli LR, Faria DR, Keesen TS & Dutra WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int Immunopharmacol* 2008; **8**: 1338–1343.
- Antonelli LR, Dutra WO, Oliveira RR, et al. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4- CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2006; **74**: 6317–6323.
- Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, et al. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania*

- antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2001; **69**: 3232–3239.
- 39 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.
- 40 Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis* 2012; **12**: 75.
- 41 Vieira EL, Keesen TS, Machado PR, et al. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunol* 2013; **35**: 65–72.
- 42 Carvalho LP, Passos S, Schriefer A & Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol* 2012; **3**: 301.
- 43 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.
- 44 Keesen TS, Antonelli LR, Faria DR, et al. CD4(+) T cells defined by their Vbeta T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 2011; **165**: 338–351.
- 45 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.
- 46 Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, et al. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol* 2010; **40**: 2830–2836.
- 47 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.
- 48 Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, et al. 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.
- 49 Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; **9**: 251–256.
- 50 Guimaraes LH, Machado PR, Lago EL, et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; **103**: 712–715.
- 51 Machado PR, Rosa ME, Costa D, et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: *in situ* and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011; **105**: 438–444.
- 52 Silveira FT, Lainson R & Corbett CE. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; **100**: 525–534.
- 53 Vieira-Goncalves R, Pirmez C, Jorge ME, et al. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermatol* 2008; **47**: 926–932.
- 54 Coutinho SG, Pirmez C & Da-Cruz AM. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; **96**(Suppl 1): S173–S178.
- 55 Bacellar O, Faria D, Nascimento M, et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 2009; **200**: 75–78.
- 56 Ojha RP, Cervantes D & Fischbach LA. Oral pentoxifylline and pentavalent antimony for treatment of leishmaniasis: promising but inconclusive evidence of superiority, compared with antimony monotherapy. *Clin Infect Dis* 2007; **45**: 1104; author reply 005–6.
- 57 Machado PR, Lessa H, Lessa M, et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2007; **44**: 788–793.
- 58 Sadeghian G & Nilforoushadeh MA. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 2006; **45**: 819–821.
- 59 Bafica A, Oliveira F, Freitas LA, Nascimento EG & Barral A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *Int J Dermatol* 2003; **42**: 203–207.
- 60 Lessa HA, Machado P, Lima F, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 2001; **65**: 87–89.
- 61 Santos Cda S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, et al. CD8(+) granzyme B(+) mediated tissue injury vs. CD4(+)IFNgamma(+) mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 2013; **133**: 1533–1540.
- 62 Nateghi Rostami M, Keshavarz H, Edalat R, et al. CD8+ T cells as a source of IFN-gamma production in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; **4**: e845.
- 63 Faria DR, Souza PE, Duraes FV, et al. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2009; **31**: 432–439.
- 64 Ruiz JH & Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2007; **29**: 671–678.
- 65 Da-Cruz AM, Conceicao-Silva F, Bertho AL & Coutinho SG. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 1994; **62**: 2614–2618.
- 66 Voelkl S, Gary R & Mackensen A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR-alpha/beta+ CD4-CD8- double-negative T cells. *Eur J Immunol* 2011; **41**: 739–748.
- 67 DAquisto F & Crompton T. CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochem Pharmacol* 2011; **82**: 333–340.
- 68 Monteiro MC, Marques FC, Blazius RD, et al. N-acetyl-L-cysteine reduces the parasitism of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res* 2008; **102**: 801–803.
- 69 Rocha-Vieira E, Ferreira E, Vianna P, et al. Histopathological outcome of Leishmania major-infected BALB/c mice is improved by oral treatment with N-acetyl-L-cysteine. *Immunology* 2003; **108**: 401–408.
- 70 Goto H & Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2009; **51**: 241–246.
- 71 Kaye PM & Aebischer T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 1462–1470.
- 72 Kaye P & Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev* 2011; **9**: 604–615.
- 73 Hailu A, Baarl DV, Knol GJ, Berhe N, Miedema F & Kager PA. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clin Immunol* 2005; **117**: 182–191.
- 74 Ansari NA, Saluja S & Salotra P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol* 2006; **119**: 339–345.
- 75 Caldas A, Favali C, Aquino D, et al. Balance of IL-10 and Interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis* 2005; **113**: 1–9.
- 76 Costa ASA, Costa GC, Aquino DMCD, et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; **107**: 735–739.
- 77 Gama MEA, Costa JML, Pereira JCR, Gomes CMC & Corbett CEP. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2004; **37**: 129–136.

- 78 Holaday B, Pompeu M, Jeronimo S, et al. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. *J Clin Investig* 1993; 92: 2626–2632.
- 79 Karp CL, El-Safi SH, Wynn TA, et al. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Investig* 1993; 91: 1644–1648.
- 80 Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YAW, et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Investig* 1993; 92: 324–329.
- 81 Kurkjian KM, Mahmutovic AJ, Kellar KL, Haque R, Bern C & Secor WE. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytometry A* 2006; 69: 353–358.
- 82 Nylen S & Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 2007; 28: 378–384.
- 83 Gautam S, Kumar R, Maurya R, et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2011; 204: 1134–1137.
- 84 Rai AK, Thakur CP, Singh A, et al. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. *PLoS ONE* 2012; 7: 1–11.
- 85 Saha S, Mondal S, Ravindran R, et al. IL-10- and TGF- β -mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of Amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. *J Immunol* 2007; 179: 5592–5603.
- 86 Khoshdel A, Alborzi A, Rosouli M, Taheri E, Kiany S & Javadian M. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- γ in patients with visceral leishmaniasis. *Braz J Infect Dis* 2009; 13: 44–46.
- 87 Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, et al. IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and IL-27) in L. braziliensis infection. *Parasite Immunol* 2011; 33: 132–136.
- 88 Bacellar O, Faria D, Nascimento M, et al. IL-17 production in patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 2009; 200: 75–78.
- 89 Magalhães LMD, Villani FNA, Nunes MdCP, Gollob KJ, Rocha MOC & Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis* 2013; 208: 661–665.
- 90 Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. Research article. *J Clin Investig* 2009; 119: 2379–2389.
- 91 Zubairi S, Sanos SL, Hill S & Kaye PM. Immunotherapy with OX40L-Fc or anti-CTLA-4 enhances local tissue responses and killing of *Leishmania donovani*. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1433–1440.
- 92 Liang SC, Greenwald RJ, Latchman YE, et al. PD-L1 and PD-L2 have distinct roles in regulating host immunity to cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 2006; 36: 58–64.
- 93 Gautam S, Kumar R, Singh N, et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2014; 209: 290–299.
- 94 Murph ML, Cotterell SEJ, Gorak PMA, Engwerda CR & Kaye M. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. *J Immunol* 1998; 161: 4153–4160.
- 95 Gomes NA, Gattass CR, Barreto-de-Souza V, Wilson ME & DosReis GA. TGF- β Mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kala azar. *J Immunol* 2000; 164: 2001–2008.
- 96 Joshi T, Rodriguez S & Perovic V. Cockburn IA, Stagerl pp. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8+T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog* 2009; 5: 1–14.
- 97 Oliveira DM, Costa MAF, Chavez-Fumagalli MA, et al. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol Res* 2012; 110: 1277–1285.
- 98 Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, Kamat V, Martin S & Saha B. Miltefosine promotes IFN- γ -dominated anti-leishmanial immune response. *J Immunol* 2009; 182: 7146–7154.
- 99 Engwerda CR, Ato M, Cotterell SEJ, et al. A role for tumor necrosis factor- α in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *Am J Pathol* 2002; 161: 429–437.
- 100 Engwerda CR, Ato M, Stager S, Alexander CE, Stanley AC & Kaye PM. Distinct roles for lymphotxin- and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. *Am J Pathol* 2004; 165: 2123–2133.
- 101 Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA & Farrell JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2848–2856.
- 102 Bhattacharjee S, Gupta G, Bhattacharya P, Adhikari A, Majumdar SB & Majumdar S. Anti-IL-10 mAb protection against experimental visceral leishmaniasis via induction of Th1 cytokines and nitric oxide. *Indian J Exp Biol* 2009; 47: 489–497.
- 103 Murray HW, Lu CM, Mauze S, et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun* 2002; 70: 6284–6293.
- 104 Murray HW, Moreira AL, Lu CM, et al. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2003; 188: 458–464.
- 105 Murray HW, Flanders KC, Donaldson DD, et al. Antagonizing deactivating cytokines to enhance host defense and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 2005; 2005: 3903–3911.
- 106 Murray HW. Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. *Infect Immun* 2008; 76: 4088–4091.
- 107 Murray HW. Interleukin 10 receptor blockade—pentavalent antimony treatment in experimental visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2005; 93: 295–301.
- 108 Rodrigues V Jr, Silva JSD & Campos-Neto A. Transforming growth factor- β and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 1998; 66: 1233–1236.
- 109 Okwor I & Uzonna J. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies. *Immunol Res* 2008; 41: 123–136.
- 110 Gollob KJ, Antonelli LR & Dutra WO. Insights into CD4+ memory T cells following *Leishmania* infection. *Trends Parasitol* 2005; 21: 347–350.
- 111 Zaph C, Uzonna J, Beverley SM & Scott P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania* major in the absence of persistent parasites. *Nat Med* 2004; 10: 1104–1110.


RESEARCH ARTICLE

Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*

Luísa M. D. Magalhães¹, Agostinho Viana¹, Egler Chiari², Lúcia M. C. Galvão^{2,3}, Kenneth J. Gollob^{4,5}, Walderez O. Dutra^{1,4*}

1 Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, **4** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **5** Programa de Pós-Graduação em Medicina e Biomedicina, Instituto de Ensino e Pesquisa, Hospital Santa Casa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

* waldutra@gmail.com


 OPEN ACCESS

Citation: Magalhães LMD, Viana A, Chiari E, Galvão LMC, Gollob KJ, Dutra WO (2015) Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis 9(7): e0003816. doi:10.1371/journal.pntd.0003816

Editor: Eric Dumonteil, Universidad Autónoma de Yucatán, MEXICO

Received: September 18, 2014

Accepted: May 5, 2015

Published: July 6, 2015

Copyright: © 2015 Magalhães et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT). WOD, KJG, EC, LMCg are CNPq fellows; LMDM and AV are CAPES fellows. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

Trypanosoma cruzi strains are currently classified into six *discrete typing units* (DTUs) named TcI to VI. It is known that these DTUs have different geographical distribution, as well as biological features. TcI and TcII are major DTUs found in patients from northern and southern Latin America, respectively. Our hypothesis is that upon infection of human peripheral blood cells, Y strain (Tc II) and Col cl1.7 (Tc I), cause distinct immunological changes, which might influence the clinical course of Chagas disease.

Methodology/Principal Findings

We evaluated the infectivity of CFSE-stained trypomastigotes of Col cl1.7 and Y strain in human monocytes for 15 and 72 hours, and determined the immunological profile of lymphocytes and monocytes exposed to the different isolates using multiparameter flow cytometry. Our results showed a similar percentage and intensity of monocyte infection by Y and Col cl1.7. We also observed an increased expression of CD80 and CD86 by monocytes infected with Col cl1.7, but not Y strain. IL-10 was significantly higher in monocytes infected with Col cl1.7, as compared to Y strain. Moreover, infection with Col cl1.7, but not Y strain, led to an increased expression of IL-17 by CD8+ T cells. On the other hand, we observed a positive correlation between the expression of TNF-alpha and granzyme A only after infection with Y strain.

Conclusion/Significance

Our study shows that while Col cl1.7 induces higher monocyte activation and, at the same time, production of IL-10, infection with Y strain leads to a lower monocyte activation but