

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES  
PORTADORES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA DA COMUNIDADE INDÍGENA  
XAKRIABÁ, MINAS GERAIS, BRASIL

por

MATHEUS FERNANDES COSTA E SILVA

BELO HORIZONTE  
OUTUBRO/2013

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES  
PORTADORES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA DA COMUNIDADE INDÍGENA  
XAKRIABÁ, MINAS GERAIS, BRASIL

por

MATHEUS FERNANDES COSTA E SILVA

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título  
de Doutor em Ciências na área de concentração  
Doenças Infecciosas e Parasitárias.  
Orientação: Dr<sup>a</sup>. Andréa Teixeira Carvalho  
Co-orientações: Dr<sup>a</sup>. Luciana Inácia Gomes  
Dr<sup>a</sup>. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

BELO HORIZONTE  
OUTUBRO/2013

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C837 Costa e Silva, Matheus Fernandes.  
2013

Caracterização de biomarcadores imunológicos em pacientes portadores de leishmaniose cutânea da comunidade indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil / Matheus Fernandes Costa e Silva. – Belo Horizonte, 2013.

XXXII, 182 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: 192 – 214

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose cutânea/Imunologia 2. Leishmania/Parasitologia 3. População Indígena I. Título. II. Teixeira-Carvalho, Andréa (Orientação). III. Gomes, Luciana Inácia(Co-orientação). IV. Peruhype-Magalhães, Vanessa (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES  
PORTADORES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA DA COMUNIDADE INDÍGENA  
XAKRIABÁ, MINAS GERAIS, BRASIL

por

MATHEUS FERNANDES COSTA E SILVA

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr<sup>a</sup>. Andréa Teixeira Carvalho (Presidente)

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis

Prof. Dr. Helton da Costa Santiago

Prof. Dr<sup>a</sup>. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Prof. Dr<sup>a</sup>. Silvane Maria Fonseca Murta

Suplente: Dr<sup>a</sup>. Ester Roffê Santiago

Tese defendida e aprovada em: 09/10/2013.

## COLABORAÇÕES

Dr<sup>a</sup>. Célia Maria Ferreira Gontijo - Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ.

Dr<sup>a</sup>. Maria Norma Melo - Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Dr<sup>a</sup>. Elizabeth de Castro Moreno - Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais - HEMOMINAS

Dr. Olindo Assis Martins Filho - Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ.

Dr<sup>a</sup>. Patrícia Flávia Quaresma - Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ.

Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier - Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

Dr<sup>a</sup>. Janaína de Moura Freire - Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ.

Me. Tiago Antônio de Oliveira Mendes - Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

*Dedico esse trabalho a toda comunidade indígena Xakriabá.*

*“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

VI

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por estar sempre presente em minha vida, mostrando-me que com fé e perseverança qualquer obstáculo pode ser superado.

À Dr<sup>a</sup>. Andréa Teixeira pela orientação exemplar desse trabalho, sempre com ética e profissionalismo. Obrigado pela confiança, ensinamentos e pelas várias oportunidades que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal desde a iniciação científica. Além disso, muito obrigado pela amizade e convivência agradável. Você é um exemplo em pesquisa científica.

À Dr<sup>a</sup>. Vanessa Peruhype pela orientação, confiança e apoio em todos os momentos. Seus ensinamentos foram fundamentais durante o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigado pela amizade e disponibilidade, e principalmente, pela oportunidade de ingressar na carreira científica.

À Dr<sup>a</sup>. Luciana Gomes pela orientação, ensinamentos, incentivos e amizade. Muito obrigado por ter me acolhido no Laboratório de Pesquisas Clínicas do CPqRR, disponibilizando toda infra-estrutura do laboratório para a realização dos ensaios moleculares. Sua contribuição foi imprescindível para a conclusão desse trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Célia Gontijo por todo apoio e suporte durante as viagens para a comunidade indígena Xakriabá. Muito obrigado pelo fornecimento de todas as informações clínicas e epidemiológicas relacionadas a comunidade indígena. Além disso, agradeço pela convivência agradável e incentivos durante a realização do trabalho.

Ao Dr. Olindo Assis pela infra-estrutura do LBDM, pelas sugestões, e principalmente, pelo exemplo de sabedoria e competência. Além disso, muito obrigado pela oportunidade de fazer parte de um grande grupo de pesquisa.

Às Dr<sup>as</sup>. Patrícia Quaresma e Janaína Freire pelo auxílio durante as viagens para a comunidade Xakriabá, pela seleção e fornecimento de dados dos pacientes avaliados. Obrigado pela amizade e convivência agradável.

Ao Dr. Márcio Sobreira pelo auxílio nos experimentos, pela amizade e disponibilidade.

Á Dr<sup>a</sup>. Danielle Zauli pelo auxílio na padronização das técnicas moleculares.

Aos colaboradores do trabalho, Dr<sup>a</sup>. Maria Norma Melo, Dr<sup>a</sup>. Elizabeth de Castro Moreno, Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier, Me. Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

A todos os alunos de iniciação científica vinculados ao projeto (Aretha Silva, Renata Silva, Dâmarys Andrade, Otoni Melo, Philipe Ferreira, Gabriela Rezende, Agna Guimarães, Aline Medeiros) pela enorme contribuição durante os experimentos e confecção de banco de dados. A participação de vocês foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

A Me. Raquel Carvalho, Marina Alves, Verônica Freire e Agnes Sampaio muito obrigado pelo auxílio nos experimentos e fornecimento de dados dos pacientes Xakriabá.

Aos Me. Amanda Cardoso, Fabiana Rocha e Maurício Azevedo muito obrigado pela amizade e auxílio nos experimentos.

Ao Dr. Edward Oliveira pelo auxílio e disponibilidade durante a realização dos experimentos no Laboratório de Pesquisas Clínicas do CPqRR.

Aos colegas dos laboratórios LBDM, Leishmanioses, Pesquisas Clínicas e Imunologia Celular e Molecular pela convivência agradável e momentos de descontração.

Ao amigo Daniel Menezes pelos conselhos, incentivos e companheirismo. Muito obrigado pelos ensinamentos em técnicas moleculares. Além disso, agradeço pelos momentos de descontração e pela enorme disponibilidade sempre que necessário. A sua amizade foi muito importante para conclusão desse trabalho.

Aos amigos Renato Abdala, Cristiano Bandeira e Fabiana Paixão pela amizade, companheirismo e pelos inúmeros momentos de descontração. Além disso, muito obrigado pelo auxílio nos experimentos. A presença e conselhos de vocês foram fundamentais para conclusão desse trabalho.

Ao corpo técnico do LBDM e Laboratório de Imunologia Celular e Molecular pela disponibilidade e preparo das soluções utilizadas nos experimentos.



À Maisa Santos e Jucélia Amorim pela enorme disponibilidade e competência. Muito obrigado por facilitar o desenvolvimento das atividades no laboratório.

À toda a equipe de saúde do município de São João das Missões e da FUNASA que tornou possível a realização do trabalho na comunidade indígena Xakriabá. Em especial gostaria de agradecer aos médicos Cândido e Joaquim pela coleta dos fragmentos de tecido dos indígenas não portadores de leishmaniose cutânea.

Aos índios Xakriabá, pelos ensinamentos e pela lição de vida que levarei sempre comigo. Espero que minha participação no projeto “*Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Comunidade indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil*” possa ter contribuído para o bem-estar e saúde dessa comunidade que possui uma história de lutas e conquistas impressionante.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências dessa tese.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade ofertada.

Ao meu primo Alisson pelos momentos de descontração e por estar sempre presente.

Aos meus familiares pelos incentivos e momentos de descontração.

Aos meus pais Gilberto e Maria Edna, meus irmãos André e Lucas, e minha sobrinha Maria Luisa pelo amor, apoio, incentivos e por tornarem minha vida muito mais completa e realizada. Vocês foram essenciais em todos os momentos desse trabalho.

À Juliana Gontijo pela dedicação, amor, carinho, companheirismo e total compreensão. Muito obrigado por você existir em minha vida.

Aos órgãos financiadores que proporcionaram a realização desse trabalho:

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

FAPEMIG (processo n°: CBB - APQ-00289-10)

CNPq (processo n°: 479408/2010-6)

FIOCRUZ (processo n°: 403562/2008-2)

CPqRR (Centro de Pesquisas René Rachou)

Comunidade Européia (Control Strategies for visceral leishmaniasis and mucocutaneous leishmaniasis in South America: applications of molecular epidemiology)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XXVII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>XXVIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XXXI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XXXII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>38</b>
3.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar no Brasil.....	39
3.2 Formas clínicas da leishmaniose tegumentar.....	40
3.3 Resposta imune na leishmaniose cutânea.....	41
3.4 O óxido nítrico e a infecção por <i>Leishmania</i> .....	46
3.5 Diagnóstico da leishmaniose cutânea.....	47
3.6 Tratamento da leishmaniose cutânea.....	49
<b>4 POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
4.1 Descrição da área estudada.....	51
4.2 Procedimentos éticos.....	52
4.3 Caracterização da população avaliada.....	53
4.3.1 Critérios de inclusão.....	54
4.3.2 Critérios de exclusão.....	54
4.4 Obtenção de formas promastigotas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> e marcação com Isotiocianato de fluoresceína (FITC).....	56
4.5 Preparação e obtenção de antígeno solúvel de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> (LSA).....	58
4.6 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE SISTÊMICA E LOCALIZADA.....	58
4.7 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO SANGUE PERIFÉRICO DA POPULAÇÃO AVALIADA.....	59
4.7.1 Ensaios de fagocitose de formas promastigotas vivas de <i>Leishmania</i> (V.) <i>braziliensis</i> .....	59

4.7.2 Avaliação do perfil imunofenotípico em monócitos do sangue periférico da população avaliada.....	60
4.7.3 Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos e linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico.....	63
4.7.4 Estratégias experimentais utilizadas para análise dos dados.....	64
4.7.5 Aquisição e análise <i>ex vivo</i> da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.....	65
4.7.6 Aquisição e análise <i>ex vivo</i> do fenótipo celular e perfil de citocinas intracitoplasmáticas em células CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>-</sup> (Leish <sup>-</sup> ) e CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>+</sup> (Leish <sup>+</sup> ) do sangue periférico por citometria de fluxo.....	66
4.7.7 Avaliação do fenótipo celular e perfil de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos e linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico, considerando a capacidade fagocítica relativa.....	69
4.7.7.1 Aquisição e análise <i>ex vivo</i> do fenótipo celular de monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.....	70
4.7.7.2 Aquisição e análise pós-estimulação <i>in vitro</i> de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos e linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo.....	71
4.7.8 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico, após estimulação <i>in vitro</i> com antígeno solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	73
4.7.8.1 Aquisição e análise <i>ex vivo</i> dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.....	75
<b>4.8 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DE LESÕES DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....</b>	<b>76</b>
4.8.1 População de estudo.....	76
4.8.2 Análise histopatológica.....	77
4.8.3 Avaliação da expressão gênica relativa por RT-qPCR.....	77
4.8.3.1 Extração simultânea de RNA e DNA total de tecidos provenientes de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea.....	77
4.8.3.2 Síntese de ácido desoxirribonucleico complementar - cDNA.....	78
4.8.3.3 Seleção de iniciadores.....	79
4.8.3.4 Avaliação da uniformidade dos níveis de expressão do controle endógeno.....	81
4.8.3.5 Avaliação da eficiência de amplificação dos iniciadores.....	81

4.8.3.6 Detecção dos níveis de expressão gênica de citocinas e quimiocinas por RT-qPCR.....	82
4.8.3.7 Análise do perfil panorâmico de citocinas e quimiocinas moduladoras/inflamatórias.....	82
4.8.3.8 Análise por Heat map e agrupamento hierárquico.....	83
4.8.4 Quantificação da carga parasitária.....	83
4.8.4.1 Fragmento alvo e iniciadores.....	83
4.8.4.2 Construção da curva padrão.....	84
4.8.4.3 PCR quantitativa em tempo real.....	84
4.9 Análise estatística dos dados.....	85
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>86</b>
5.1 TÓPICO I: Avaliação da capacidade fagocítica e caracterização do perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	88
5.1.1 Avaliação da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	89
5.1.1.1 Avaliação de receptores Fcγ (CD16, CD32 e CD64) e receptor do Complemento (CD35) em células CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>-</sup> (Leish <sup>-</sup> ) e CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>+</sup> (Leish <sup>+</sup> ) do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	90
5.1.1.2 Avaliação de moléculas de ativação (HLA-DR, MHC-I e CD23) em células CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>-</sup> (Leish <sup>-</sup> ) e CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>+</sup> (Leish <sup>+</sup> ) do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	91
5.1.1.3 Avaliação de moléculas de co-estimulação (CD80 e CD86) em células CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>-</sup> (Leish <sup>-</sup> ) e CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>+</sup> (Leish <sup>+</sup> ) do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	93
5.1.1.4 Avaliação de receptores <i>Toll</i> (TLR-2 e TLR-4) em células CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>-</sup> (Leish <sup>-</sup> ) e CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>+</sup> (Leish <sup>+</sup> ) do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	94

5.1.1.5 Avaliação do perfil de citocinas intracelulares (IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$ ,) em células CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>-</sup> (Leish <sup>-</sup> ) e CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>+</sup> (Leish <sup>+</sup> ) do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	95
5.1.2 Avaliação do perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa.....	97
5.1.2.1 Avaliação de receptores Fc $\gamma$ (CD16, CD32 e CD64) e receptor do Complemento (CD35) em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa.....	98
5.1.2.2 Avaliação de moléculas de ativação (HLA-DR, MHC-I e CD23) em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa.....	99
5.1.2.3 Avaliação de moléculas de co-estimulação (CD80 e CD86) em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa.....	101
5.1.2.4 Avaliação de receptores <i>Toll</i> (TLR-2 e TLR-4) em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa.....	102
5.1.2.5 Avaliação do perfil de citocinas intracelulares (IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$ ) em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa.....	103
5.1.2.6 Avaliação do perfil de citocinas intracelulares (IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 e IL-4) em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa.....	104
5.1.2.7 Avaliação do perfil de citocinas intracelulares (IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$ e IL-17) em linfócitos T CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa.....	106
5.1.3 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea.....	107
5.1.4 Avaliação da capacidade fagocítica e perfil fenotípico-funcional em monócitos e linfócitos T do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão.....	109

5.1.4.1 Avaliação da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea após interação com promastigotas vivas de <i>L. (V.) braziliensis</i> , de acordo com o tempo de evolução da lesão.....	109
5.1.4.2 Avaliação de receptores Fcγ, do Complemento e Toll, moléculas de ativação e co-estimulação em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão.....	110
5.1.4.3 Avaliação do perfil de citocinas intracelulares em monócitos e linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão.....	111
5.1.4.4 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão.....	113
5.2 TÓPICO II: Caracterização da resposta imune no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea.....	114
5.2.1 Caracterização da população de estudo.....	115
5.2.2 Análise histopatológica.....	117
5.2.3 Quantificação da carga parasitária no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão.....	119
5.2.4 Análise por Heat map e agrupamento hierárquico.....	119
5.2.5 Perfil de expressão gênica no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão.....	121
5.2.6 Perfil panorâmico de citocinas e quimiocinas inflamatórias/moduladoras no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão.....	123
5.2.7 Análise de correlação entre citocinas analisadas no sangue periférico e citocinas/quimiocinas expressas no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão.....	124
5.2.7.1 Monócitos circulantes X Infiltrado inflamatório.....	124
5.2.7.2 Linfócitos T circulantes X Infiltrado inflamatório.....	126
5.3 TÓPICO III: Síntese dos resultados.....	129

5.3.1 Alterações fenotípico-funcionais em monócitos circulantes da população avaliada que não fagocitaram (CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>-</sup> /Leish <sup>-</sup> ) e fagocitaram (CD14 <sup>+</sup> FL-1 <sup>+</sup> /Leish <sup>+</sup> ) promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	130
5.3.2 Alterações fenotípico-funcionais em monócitos e linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> circulantes da população avaliada, considerando a capacidade fagocítica relativa.....	131
5.3.3 Alterações fenotípico-funcionais no sangue periférico e perfil de expressão gênica no infiltrado inflamatório da lesão de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão.....	133
5.3.4 Proposição de biomarcadores associados à resistência à LC e ao desenvolvimento e manutenção da lesão.....	134
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	136
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	152
<b>8 ANEXOS</b> .....	154
8.1 Ministério da Saúde/Conselho Nacional de Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.....	155
8.2 Ministério da Saúde/Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisa René Rachou/Comitê de Ética.....	158
8.3 Ministério da Justiça/Fundação Nacional do Índio - Autorização para ingresso em Terra indígena.....	159
8.4 Publicação científica do estudo intitulada “Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis”, Costa-Silva et al. <i>Molecular Immunology</i> , 2013.....	160
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	192



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Vias metabólicas da L-arginina na leishmaniose cutânea. O metabolismo da L-arginina desempenha papel-chave na ativação de macrófagos e sobrevivência da *Leishmania*. A ativação clássica de macrófagos por citocinas da *resposta Tipo 1* (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2) induz maior atividade da enzima iNOS e produção de NO e citrulina. A síntese de NO leva à formação de reativos de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NROS) e eliminação do parasito. A ativação alternativa de macrófagos por citocinas da *resposta Tipo 2* (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13) promove maior atividade da enzima arginase, resultando na síntese de poliaminas (putrescina, espermidina e, espermina). As poliaminas são utilizadas como nutrientes pelas formas amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo, contribuindo para o crescimento do parasito e proliferação da infecção..... 47
- Figura 2:** Localização geográfica do município de São João das Missões, Minas Gerais, Brasil, destacando-se em verde a região ocupada pela Comunidade Indígena Xakriabá..... 51
- Figura 3:** Vista panorâmica da comunidade indígena Xakriabá, localizada na região norte do estado de Minas Gerais, Brasil..... 52
- Figura 4:** Desenho esquemático, ilustrando procedimentos realizados para classificação da população avaliada. Após realização dos exames diagnósticos, a população estudada foi categorizada em três diferentes grupos: grupo com leishmaniose cutânea (LC), grupo com teste Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL) e grupo controle (CT)..... 54
- Figura 5:** Caracterização das lesões dos pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC) da comunidade indígena Xakriabá. A Figura **5A** representa um paciente com apenas uma lesão do tipo úlcero-crostosa. **5B** representa um paciente com duas lesões vegetantes. **5C** representa um paciente com lesão típica em forma de úlcera ovalada de base eritematosa, infiltrada com fundo avermelhado e bordas bem delimitadas e elevadas. **5D** representa um paciente com lesão atípica em forma de placa ulcerada..... 56
- Figura 6:** Esquema ilustrativo da seleção e marcação de formas promastigotas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis*. A figura **6A** representa o perfil de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, selecionadas na janela “gate Promastigotas” em gráfico de distribuição pontual de tamanho versus granulosidade. A figura **6B** representa a intensidade média de fluorescência apresentada pelos parasitos após a marcação com FITC em gráfico de histograma..... 57
- Figura 7:** Desenho esquemático, ilustrando as estratégias experimentais utilizadas para caracterização da resposta imune no sangue periférico e no infiltrado

inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. \*A avaliação da produção de óxido nítrico intracelular foi realizada após estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania* (LSA)..... 59

**Figura 8:** Desenho esquemático, ilustrando estratégias experimentais utilizadas para análise da capacidade fagocítica e perfil fenotípico-funcional da população avaliada, de acordo com as classificações propostas..... 65

**Figura 9:** Análise representativa da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico da população avaliada (grupo com teste de Montenegro positivo sem lesão - TM<sup>+</sup>sL) por citometria de fluxo. A figura **9A** representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) em função da granulocidade. A figura **9B** representa o perfil de análise da população de monócitos na ausência de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em gráfico de densidade de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). A figura **9C** representa o perfil de análise da população de monócitos na presença de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* marcadas com FITC, indicando no quadrante duplo positivo (Q2) o percentual de monócitos que fagocitaram o parasito-FITC em gráfico de densidade de fluorescência-1 (FITC) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP)..... 66

**Figura 10:** Análise de células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> (Leish<sup>-</sup>) e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> (Leish<sup>+</sup>) do sangue periférico da população avaliada (grupo com leishmaniose cutânea - LC) por citometria de fluxo. A figura **10A** representa o perfil celular da população de monócitos (células CD14<sup>+</sup>), selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) em função da granulocidade. **10B** representa o perfil de análise de células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> em gráfico de contorno de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). **10C** e **10D** representam o perfil de análise de células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup>, respectivamente, positivas para CD16 no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (CD16-PE) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). **10E** e **10F** representam a análise da molécula HLA-DR por intensidade média de fluorescência (IMF) na população de células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup>, respectivamente, em gráfico de histograma de fluorescência-2 (HLA-DR-PE) versus número de eventos. **10G** e **10H** representam o perfil de análise de células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup>, respectivamente, positivas para citocina TGF- $\beta$  no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (TGF- $\beta$ -PE) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP)..... 68

**Figura 11:** Estratégia para cálculo do índice “Capacidade fagocítica relativa”. A figura **11A** representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) versus granulocidade. **11B** representa o perfil de análise de monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> em gráfico de contorno de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). A fórmula utilizada para cálculo do índice “Capacidade fagocítica relativa” está ilustrada dentro do gráfico..... 70

**Figura 12:** Análise do fenótipo celular de monócitos do sangue periférico da população avaliada (grupo com teste de Montenegro positivo sem lesão - TM<sup>+</sup>sL) por citometria de fluxo. A figura **12A** representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) versus granulocidade. A figura **12B** representa o perfil de análise da população de monócitos positivos para CD23 no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (CD23-PE) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP)..... 71

**Figura 13:** Análise do fenótipo celular de monócitos do sangue periférico da população avaliada (grupo com leishmaniose cutânea - LC) por citometria de fluxo. A figura **13A** representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) versus granulocidade. A figura **13B** representa a detecção da molécula CD35 na população de monócitos, em gráfico de histograma de fluorescência-2 (CD35-PE) versus número de eventos..... 71

**Figura 14:** Análise de monócitos do sangue periférico da população avaliada (grupo com leishmaniose cutânea - LC) por citometria de fluxo. A figura **14A** representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) versus granulocidade. A figura **14B** representa o perfil de análise da população de monócitos positivos para citocina TNF- $\alpha$  no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (TNF- $\alpha$ -PE) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP)..... 72

**Figura 15:** Análise de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico da população avaliada (grupo controle - CT) por citometria de fluxo. A figura **15A** representa o perfil celular da população de linfócitos totais, selecionada na janela “gate” linfócitos totais em gráfico de densidade de tamanho versus granulocidade. A figura **15B** representa o perfil de análise da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> positivos para citocina IL-4 no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (IL-4-PE) versus fluorescência-3 (CD4-PerCP)..... 73

**Figura 16:** Análise de linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico da população avaliada (grupo controle - CT) por citometria de fluxo. A figura **16A** representa o perfil celular da população de linfócitos totais, selecionada na janela “gate” linfócitos totais em gráfico de densidade de tamanho versus granulocidade. A figura **16B** representa o perfil de análise da população de linfócitos TCD8<sup>+</sup> positivos para citocina IL-10 no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de densidade de fluorescência-2 (IL-10-PE) versus fluorescência-3 (CD8-PerCP)..... 73

**Figura 17:** Análise dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico da população avaliada (grupo com teste de Montenegro positivo sem lesão - TM<sup>+</sup>sL) por citometria de fluxo. A figura **17A** representa o perfil celular da

população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de granulosidade versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). A figura **17B** representa o perfil de análise da população de monócitos na ausência do reagente DAF-2DA em gráfico de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). A figura **17C** representa o perfil de análise da população de monócitos produtores de NO (DAF-2T<sup>+</sup>) no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de densidade de fluorescência-1 (DAF-2T) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP)..... 75

**Figura 18:** Avaliação da uniformidade dos níveis de expressão de *ACTB* da população avaliada por RT-qPCR. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão dos níveis de C<sub>t</sub> em formato de gráficos de barras..... 81

**Figura 19:** Avaliação da capacidade fagocítica de monócitos de indivíduos dos grupos Controle (□ = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (■ = 15) e Leishmaniose cutânea (■ = 23). Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do percentual de células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente..... 89

**Figura 20:** Avaliação do perfil de receptores Fcγ e do complemento em monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23). Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do percentual do receptor CD16 (A) e intensidade média de fluorescência (IMF) dos receptores CD32 (B), CD64 (C) e CD35 (D) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> estão representadas por asterisco (\*)...... 91

**Figura 21:** Avaliação de moléculas de ativação em monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23). Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil da intensidade média de fluorescência (IMF) de HLA-DR (A), MHC-I (B) e percentual de CD23 (C) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> estão representadas por asterisco (\*)...... 93

**Figura 22:** Avaliação de moléculas de co-estimulação em monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23). Os resultados

estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do percentual de CD80 (A) e intensidade média de fluorescência (IMF) de CD86 (B) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> estão representadas por asterisco (\*)..... 94

**Figura 23: Avaliação de receptores Toll em monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23).** Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil da intensidade média de fluorescência (IMF) dos receptores TLR-2 (A) e TLR-4 (B) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> estão representadas por asterisco (\*)..... 95

**Figura 24: Avaliação do perfil de citocinas intracelulares em monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23).** Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do percentual das citocinas IL-12 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C) e TGF- $\beta$  em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> estão representadas por asterisco (\*)..... 97

**Figura 25: Avaliação do perfil de receptores Fc $\gamma$  e do complemento em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE dos receptores CD16 (A), CD32 (B), CD64 (C) e CD35 (D) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com  $\downarrow$  capacidade fagocítica e  $\uparrow$  capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*)..... 99

**Figura 26: Avaliação de moléculas de ativação em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo

interquartil do IE das moléculas HLA-DR (A), MHC-I (B) e CD23 (C) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ↓ capacidade fagocítica e ↑ capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*). 100

**Figura 27: Avaliação de moléculas de co-estimulação em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE das moléculas CD80 (A) e CD86 (B) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ↓ capacidade fagocítica e ↑ capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*). 101

**Figura 28: Avaliação de receptores do tipo Toll em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE dos receptores TLR-2 (A) e TLR-4 (B) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ↓ capacidade fagocítica e ↑ capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*). 102

**Figura 29: Avaliação de citocinas intracelulares em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE das citocinas IL-12 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C) e TGF- $\beta$  (D) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ↓ capacidade fagocítica e ↑ capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*). 104

**Figura 30: Avaliação de citocinas intracelulares em linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-17 (B), IL-10 (C) e IL-4 (D) em linfócitos T CD4<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com  $\downarrow$  capacidade fagocítica e  $\uparrow$  capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*)...... 105

**Figura 31: Avaliação de citocinas intracelulares em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-17 (B), IL-10 (C) e IL-4 (D) em linfócitos T CD8<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com  $\downarrow$  capacidade fagocítica e  $\uparrow$  capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*)...... 107

**Figura 32: Avaliação dos níveis de NO intracelular em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23).** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre culturas estimuladas por LPS e Ag-Leish/cultura controle e intervalo interquartil do IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre os estímulos LPS e Ag-Leish foram consideradas quando o valor de  $p < 0,05$ . As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. .... 108

**Figura 33: Avaliação da capacidade fagocítica de monócitos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do IE de células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras que representam os grupos lesão recente (■ = 07) e tardia (■ = 16). A diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi considerada quando o valor de  $p < 0,05$ . .... 110

**Figure 34: Avaliação do perfil imunofenotípico em monócitos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** Os resultados estão apresentados

como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE dos receptores Fc $\gamma$  CD16 (A), CD32 (B) e CD64 (C), do complemento CD35 (D), moléculas de ativação HLA-DR (E), MHC-I (F) e CD23 (G), moléculas de co-estimulação CD80 (H) e CD86 (I) e receptores *Toll* TLR-2 (J) e TLR-4 (K) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos lesão recente (■, n = 07) e tardia (■, n = 16) foram consideradas quando o valor de  $p < 0,05$ ..... 111

**Figura 35: Avaliação do perfil de citocinas intracelulares em monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE das citocinas IL-12 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C) e TGF- $\beta$  (D) em células CD14<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 e IL-4 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (E a L) em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos lesão recente (■, n = 07) e tardia (■, n = 16) foram consideradas quando o valor de  $p < 0,05$ ..... 112

**Figura 36: Avaliação dos níveis de NO intracelular em monócitos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre culturas estimuladas por LPS e Ag-Leish/cultura controle e intervalo interquartil do IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre os estímulos LPS e Ag-Leish foram consideradas quando o valor de  $p < 0,05$ . As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos lesão recente (n = 07) e tardia (n = 16) estão representadas pela letra **a**..... 113

**Figura 37: Análise histopatológica da população avaliada.** As Figuras **1A** e **1B** representam fotomicroscopias de paciente do grupo controle com hiperqueratose e hiperplasia focal de queratinócitos basais. Ausência de infiltrado inflamatório. **1C** e **1D** representam paciente portador de leishmaniose cutânea (LC) com leve hiperqueratose e reação exsudativa com discreto infiltrado inflamatório mononuclear, composto predominantemente por linfócitos e plasmócitos. **1E** e **1F** representam paciente portador de LC com reação exsudativa caracterizada por necrose focal e moderado infiltrado inflamatório misto, rico em linfócitos, plasmócitos e histiócitos. **1G** e **1H** representam paciente portador de LC com reação exsudativa e necrótico-granulomatosa caracterizada por acentuado infiltrado inflamatório misto, rico em linfócitos, plasmócitos e histiócitos. Presença de células gigantes multinucleadas (seta curta) e de amastigotas intracelulares (seta longa). As lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina (H&E). **Painel à esquerda:** fotomicroscopias com ampliação de 20x; **Painel à direita:** fotomicroscopias com ampliação de 63x..... 118



**Figura 38: Quantificação da carga parasitária em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do número de cópias de SSU rRNA em formato de gráficos de barras que representam os grupos lesão recente (■ = 07) e tardia (■ = 10). A diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi considerada quando o valor de  $p < 0,05$ ..... 119

**Figura 39: Heat map e agrupamento hierárquico de genes expressos em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), segundo tipo, tempo e número de lesão, respectivamente.** A expressão relativa dos genes avaliados foi apresentada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e os dados plotados foram convertidos para *score-Z*. Os pacientes foram estratificados por tipo (cinza representa lesões típicas e azul atípicas), tempo (ciano representa lesões recentes e magenta tardias) e número de lesões (laranja representa uma e violeta mais do que uma lesão)..... 121

**Figura 40: Perfil de expressão gênica em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** Níveis de transcritos de citocinas e quimiocinas moduladoras (IL10, TGFB1, IL4 - A a C) e inflamatórias (IL12B, IFNG, TNF, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10 - D a J) no infiltrado inflamatório de pacientes dos grupos lesão recente (■ = 09) e tardia (■ = 09). Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos lesão recente e tardia foram consideradas quando o valor de  $p < 0,05$ ..... 122

**Figura 41: Perfil panorâmico da expressão gênica relativa de citocinas e quimiocinas em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** O perfil global das citocinas/quimiocinas reguladoras/anti-inflamatória IL10, TGFB1, IL4 (■) e inflamatórias IL12B, IFNG, TNF, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10 (■) está representado por uma curva ascendente da frequência de pacientes que apresentam alta expressão de mRNA dos genes avaliados. A análise comparativa do perfil panorâmico de citocinas e quimiocinas entre os grupos lesão recente (—■— —■—) e tardia (—▲— —▲—) foi realizada por sobreposição das assinaturas (rodapé). As linhas pontilhadas destacam os percentis 25, 50 e 75 usados como referência para análises comparativas. Diferenças significativas foram consideradas quando a frequência de determinada citocina/quimiocina ultrapassou o percentil 50, representada por um asterisco (\*)...... 124

**Figura 42: Correlações entre citocinas sintetizadas por monócitos circulantes e citocinas/quimiocinas expressas em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** Os resultados estão apresentados em formato de gráficos de dispersão com valores individuais. Índices de correlação de

*Spearman* (*r*) estão apresentados nos gráficos e correlações estatisticamente significativas entre as citocinas avaliadas foram consideradas quando o valor de *p* <0,05. Linhas conectivas representam correlações positiva e negativa. Os valores de “*r*” e “*p*” para cada correlação estão inseridos dentro dos gráficos..... 126

**Figura 43: Correlações entre citocinas sintetizadas por linfócitos T circulantes e citocinas/quimiocinas expressas em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente: ≤ 3 meses e tardia: > 3 meses).** Os resultados estão apresentados em formato de gráficos de dispersão com valores individuais. Índices de correlação de *Spearman* (*r*) estão apresentados nos gráficos e correlações estatisticamente significativas entre as citocinas e quimiocinas avaliadas foram consideradas quando o valor de *p* <0,05. Linhas conectivas representam correlações positiva e negativa. Os valores de “*r*” e “*p*” para cada correlação estão inseridos dentro dos gráficos..... 128

**Figura 44: Síntese das alterações fenotípico-funcionais em monócitos circulantes da população avaliada que não fagocitaram (Leish<sup>-</sup>) e fagocitaram (Leish<sup>+</sup>) promastigotas de *L. (V.) braziliensis*.** As setas azuis e vermelhas representam menor ou maior, respectivamente, percentual/intensidade média de fluorescência dos marcadores e citocinas intracitoplasmáticas avaliados. As alterações comuns aos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC estão assinaladas em verde claro..... 131

**Figura 45: Síntese das alterações fenotípico-funcionais em monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes da população avaliada, considerando a capacidade fagocítica relativa.** As setas azuis e vermelhas representam menor ou maior, respectivamente, percentual/intensidade média de fluorescência dos marcadores, citocinas e óxido nítrico intracitoplasmático avaliados. As alterações comuns aos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC estão assinaladas em verde claro..... 133

**Figura 46: Síntese das alterações fenotípico-funcionais no sangue periférico (A) e perfil de expressão gênica em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC) (B), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente: ≤ 3 meses e tardia: > 3 meses).** Na Figura A, as setas azuis e vermelhas representam menor ou maior, respectivamente, IE dos marcadores, citocinas e óxido nítrico intracitoplasmático avaliados. Na Figura B, a seta vermelha representa maiores níveis de transcritos das citocinas avaliadas e carga parasitária..... 134

**Figura 47: Biomarcadores associados à resistência à leishmaniose cutânea (LC) e ao desenvolvimento e manutenção da lesão.** As citocinas inflamatórias IL-12 e IL-17 e a produção de óxido nítrico estariam associadas à resistência à leishmaniose cutânea (LC) e a citocina TNF- $\alpha$  estaria associada ao desenvolvimento e manutenção da lesão..... 135

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Caracterização da população avaliada.....	55
<b>Tabela 2:</b> Anticorpos utilizados para avaliação do perfil imunofenotípico de monócitos.....	62
<b>Tabela 3:</b> Anticorpos utilizados para avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas.....	64
<b>Tabela 4:</b> Iniciadores utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR e suas características.....	80
<b>Tabela 5:</b> Caracterização da população avaliada e análise histopatológica de biópsias de pele.....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ACTB	Gene Beta-actina
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
AG	Aminoguanidina
Ag-Leish	Estímulo pelo antígeno solúvel de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
ANOVA	Análises de Variâncias
BFA	Brefeldina A
C3	Terceiro Componente do Complemento
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CR	Receptor do Complemento
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CPqRR	Centro de Pesquisa René Rachou
DAF-2DA	Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazolofluoresceína
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FL	Fluorescência
FLS	<i>Facs Lysing Solution</i>
FSC	Tamanho celular
FUNAI	Fundação Nacional do Índio
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL	Interleucina
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
IE	Índice de Estimulação
iNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida
Kg	Quilograma
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa

LC	Leishmaniose Cutânea
LD	Leishmaniose Disseminada
Leish <sup>-</sup>	Monócitos que não fagocitaram formas promastigotas de <i>L. (Viannia) braziliensis</i>
Leish <sup>+</sup>	Monócitos que fagocitaram formas promastigotas de <i>L. (Viannia) braziliensis</i>
LM	Leishmaniose Mucosa
LPS	Lipopolissacarídeo
LSA	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MFF	Solução Fixadora
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Mili Molar
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear kappa B
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares associados a Patógenos
PBS 1X	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,4
PBS-W	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,4 contendo 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica
PBS-P	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,4 contendo 0,5% de albumina bovina sérica, 0,1% de azida sódica e saponina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Clorofila Piridinina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
SFB	Soro Fetal Bovino

SSC	Granulosidade celular
TM	Teste intradérmico de Montenegro
TLR	Receptor <i>Toll</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## RESUMO

A leishmaniose cutânea (LC) é uma doença inflamatória crônica causada por espécies dermatrópicas pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, sendo a *L. (V.) braziliensis* o principal agente etiológico no Brasil. O estabelecimento e evolução das lesões causadas pela infecção por *L. (V.) braziliensis* são altamente dependentes da imunidade celular, contudo um estudo que avalia o impacto da interação parasito-monócitos no perfil de resposta imune associado ao estabelecimento/manutenção da infecção em humanos ainda não foi realizado. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar biomarcadores imunológicos, no sangue periférico e no infiltrado inflamatório de lesões cutâneas, em indígenas da comunidade Xakriabá portadores de LC (grupo LC) e com teste de Montenegro positivo sem lesão (grupo TM<sup>+</sup>sL), com intuito de melhor compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na progressão dessa patologia, bem como dos eventos associados à resistência à infecção. A análise dos resultados mostrou que pacientes do grupo LC apresentaram menor capacidade em internalizar formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* em relação ao grupo TM<sup>+</sup>sL. Além disso, observou-se que pacientes do grupo LC apresentaram perfil ativado, principalmente pelo maior percentual/Índice de Estimulação (IE) da molécula de ativação CD23, com produção de altos níveis de TNF- $\alpha$ , provenientes de monócitos que não fagocitaram e fagocitaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Contudo, os níveis de TNF- $\alpha$  correlacionaram de forma negativa com a produção de NO, sugerindo que essa citocina estaria muito mais associada ao desenvolvimento das lesões do que controle da doença. Por outro lado, pacientes do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior equilíbrio entre a produção de citocinas inflamatórias (IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-17) e moduladoras (IL-10, IL-4) e sintetizaram maiores níveis de NO, indicando que esse perfil de resposta imune balanceada e efetora poderia combater a infecção sem provocar dano tecidual. A análise do perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes e de citocinas e quimiocinas no infiltrado inflamatório das lesões mostrou que o tempo de evolução da lesão teve grande influência no perfil de resposta imune dos pacientes do grupo LC. Nesse contexto, observou-se que monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes de pacientes do grupo lesão recente apresentaram menor IE das moléculas de ativação CD23 e co-estimulação CD80, acompanhado pela menor produção das citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-17) e moduladoras (IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4) em relação ao grupo lesão tardia. Por outro lado, observou-se que esses pacientes apresentaram maior capacidade fagocítica juntamente com maior IE de monócitos expressando os receptores CD16, TLR-2 e TLR-4 e produção de NO. A análise da resposta imune localizada mostrou que pacientes do grupo lesão recente apresentaram maiores níveis de transcritos de IL12B, IFNG, TNF, IL10, TGFB1, IL4, CCL2, CCL3, CCL5 e CXCL10, bem como maior carga parasitária em relação ao grupo lesão tardia. Os resultados obtidos no presente estudo forneceram informações importantes sobre a infecção causada pela *L. (V.) braziliensis*, permitindo a identificação e proposição de potenciais biomarcadores associados à resistência à LC (IL-12, IL-17 e NO) e ao desenvolvimento e manutenção da lesão (TNF- $\alpha$ ). Além disso, esse foi o primeiro estudo que avaliou aspectos imunológicos da LC em uma população indígena brasileira.

## ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a chronic inflammatory disease caused by dermatropic *Leishmania* species belonging to the *Viannia* and *Leishmania* subgenera, with *Leishmania (V.) braziliensis* considered the main agent in Brazil. The establishment and evolution time of the lesions caused by *L. (V.) braziliensis* infection are highly affected by the cellular immunity. However, a study evaluating the impact of parasite-monocyte interactions in the immune response profile associated with the establishment/maintenance of the infection in humans has not been previously performed. In this context, the aim of this study was to characterize immunological biomarkers in peripheral blood as well as in inflammatory infiltrate of cutaneous lesions from patients with CL (CL group) or with positive Montenegro skin test without injury (TM<sup>+</sup>sL group) living in the Xakriabá indigenous community, Minas Gerais, Brazil, in order to better understand the mechanisms involved in the disease progression as well as events associated with resistance to the infection. The results showed that CL group presented less ability to internalize promastigotes of *L. (V.) braziliensis* as compared with the TM<sup>+</sup>sL group. Furthermore, it was observed that patients of the CL group showed activated profile, with high percentage/Stimulation Index (SI) of CD23, and production of high levels of TNF- $\alpha$  by monocytes that non phagocytized and phagocytized promastigotes of *L. (V.) braziliensis*. However, the levels of TNF- $\alpha$  were negatively correlated with NO production, suggesting that this cytokine would be much more related to the development of lesions instead of disease control. On the other hand, patients from TM<sup>+</sup>sL group showed better balance between the production of inflammatory (IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-17) and modulatory (IL-10, IL-4) cytokines, and synthesized highest levels of NO, indicating that this balanced immune response profile may contribute to the infection resolution without causing tissue damage. The analysis of the phenotypic-functional profile of circulating monocytes, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells, and cytokines and chemokines in the inflammatory infiltrate of the cutaneous lesions showed that the evolution time of lesions had great influence in the immune response profile of the CL group. In this context, it was observed that circulating monocytes, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes of the recent lesion group showed a lower SI of CD23 and CD80, accompanied by lower production of inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-17) and modulatory (IL-10, TGF- $\beta$  and IL-4) cytokines as compared with late lesion group. On the other hand, it was observed that these patients showed greater phagocytic capability along with the highest SI of monocytes expressing CD16, TLR-2 and TLR-4, and NO production. The analysis of the localized immune response showed that patients of the recent lesion group presented higher transcript levels of IL12B, IFNG, TNF, IL10, TGFB1, IL4, CCL2, CCL3, CCL5 and CXCL10, as well as higher parasite burden as compared with late lesion group. This study has provided important information about the infection caused by *L. (V.) braziliensis* allowing the identification of potential biomarkers associated to the resistance to CL (IL-12, IL-17 and NO) and to the development and maintenance of the lesion (TNF- $\alpha$ ). Furthermore, this was the first study that evaluated immunological aspects of CL in a Brazilian indigenous population.





A importância da leishmaniose tegumentar (LT) como problema de saúde pública reside não apenas na sua elevada incidência, como também no risco da ocorrência da forma clínica mucocutânea de difícil tratamento e que pode produzir deformidades.

O estilo de vida dos povos indígenas e as condições sociais a que estão submetidos, má nutrição, falta de higiene e saneamento, convívio estreito com animais no ambiente doméstico e peridomiciliar, favorecem a transmissão de diversas parasitoses, dentre elas, a leishmaniose cutânea (LC) (Pena 2004, Quaresma 2011). Dessa forma, trata-se de uma oportunidade rara e pioneira estudar aspectos imunológicos relacionados à LC em povos indígenas. Neste trabalho, a comunidade indígena Xakriabá (região norte do estado de Minas Gerais) foi escolhida para o estudo, principalmente em função do interesse dos próprios indígenas, manifestado em reuniões prévias com membros de nossa equipe, representantes da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e das instituições municipais.

O estabelecimento e evolução das lesões causadas pela infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* são altamente dependentes da imunidade celular (Pirmez et al. 1993, Da-Cruz et al. 1994, Coutinho et al. 1996, Baratta-Masini et al. 2007, Freitas-Teixeira et al. 2012). Sendo assim, estudos realizados em modelos experimentais (Sadick et al. 1990, Locksley & Scott 1991, Monteforte et al. 2000) e em humanos (Rocha et al. 1999, Follador et al. 2002, Souza et al. 2012) têm tentado elucidar o papel da resposta imune celular no desenvolvimento dos perfis de resistência e suscetibilidade à infecção causada por *Leishmania*. Contudo, um estudo que avalia o impacto da interação parasito-monócitos no perfil de resposta imune associado ao estabelecimento/manutenção da infecção em humanos ainda não foi realizado. Nesse contexto, o presente trabalho irá avaliar aspectos associados à progressão e imunidade da infecção humana na comunidade indígena Xakriabá. A possibilidade de se avaliar a interação *Leishmania*/monócitos e seu impacto na expressão de marcadores de ativação e co-estimulação, receptores envolvidos na interação/internalização do parasito, bem como na síntese de citocinas por monócitos e linfócitos, permitirá melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na progressão dessa patologia, bem como dos eventos associados à resistência à infecção. Além disso, a caracterização da resposta imune localizada no infiltrado inflamatório das lesões por meio da análise de expressão gênica de citocinas e quimiocinas complementar as informações obtidas no sangue periférico e traçará um perfil mais amplo da população avaliada. E por fim, será avaliado também o impacto que o tempo de evolução de lesão trará para o perfil de resposta imune encontrado. Sendo assim, a hipótese do trabalho é que pacientes do grupo LC apresentarão capacidade fagocítica reduzida e direcionamento da resposta imune para o pólo inflamatório,

o que estaria associado ao desenvolvimento de lesões cutâneas. A resposta imune de pacientes do grupo LC apresentará um perfil diferenciado quando houver a segregação dos pacientes de acordo com o tempo de evolução de lesão. Por outro lado, pacientes do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentarão perfil de resposta imune balanceado com maior capacidade leishmanicida, o que favoreceria o controle da infecção sem levar ao dano tecidual.

Cabe ressaltar ainda que esse trabalho é subprojeto de um projeto mais amplo intitulado, “*Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Comunidade indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil*”, coordenado pelas Dr<sup>as</sup>. Maria Norma Melo da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Célia Maria Ferreira Gontijo da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) - Minas Gerais. A elaboração do projeto baseou-se na perspectiva de combinar diferentes aspectos da pesquisa na LC. Para isso, uma equipe multidisciplinar e interinstitucional foi montada, configurando uma oportunidade interessante de congregar esforços de pesquisadores, que normalmente desenvolvem pesquisas independentes, racionalizando custos e com amplas condições de produzir um melhor conhecimento das questões a serem estudadas.



### 2.1 *Objetivo geral*

Caracterizar biomarcadores imunológicos em pacientes portadores de leishmaniose cutânea da comunidade indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.

### 2.2 *Objetivos específicos*

Avaliar a capacidade de monócitos do sangue periférico em internalizar formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*, de acordo ou não com o tempo de evolução da lesão;

Caracterizar o perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico, de acordo ou não com o tempo de evolução da lesão;

Analisar as características histopatológicas de biópsias da lesão de pele de pacientes portadores de leishmaniose cutânea;

Quantificar a carga parasitária no infiltrado inflamatório das lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão;

Caracterizar a resposta imune localizada no infiltrado inflamatório das lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão.



As leishmanioses referem-se a um espectro de doenças causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Os parasitos são transmitidos pela picada de fêmeas de insetos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. São parasitos intracelulares obrigatórios que se reproduzem por divisão binária, dentro do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos susceptíveis (Lainson & Shaw 1987, David & Craft 2009). Em função do caráter espectral das manifestações clínicas, diferentes classificações para a doença já foram propostas (Pearson & Sousa 1996, Grevelink & Lerner 1996). Entretanto a Organização Mundial de Saúde (OMS) divide e caracteriza as leishmanioses em 2 grupos: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Visceral (LV).

A taxonomia do gênero *Leishmania* é bastante complexa. Sendo assim, após extensa revisão, Lainson & Shaw (1987) propuseram a organização das espécies que parasitam o homem em dois subgêneros: subgênero *Leishmania* e *Viannia*. No Brasil, as principais espécies que causam doença humana são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum (chagasi)*, sendo as três primeiras dermatrópicas e associadas à LT e a última associada à LV (Cupolillo et al. 1994). Além dessas, outras espécies dermatrópicas de *Leishmania* foram recentemente descritas: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, com poucos casos no Pará e *L. (V.) shawi*, encontradas nos Estados do Pará e Amazonas (Gontijo & Carvalho 2003).

As leishmanioses compreendem uma das dez endemias mundiais de prioridade pela Organização Mundial de Saúde (OMS) devido ao caráter endêmico em 88 países de várias regiões do mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais das Américas, África, Ásia e Europa (David & Craft 2009, Kaye & Scott 2011). Estima-se que aproximadamente 12 milhões de pessoas estejam atualmente infectadas e que cerca de 350 milhões encontram-se em risco de adquirir a doença, com incidência anual estimada em cerca de 1 - 1,5 milhões de casos para a LT e 500.000 casos para a LV (Murray et al. 2005, Ameen 2010, WHO 2013).

### 3.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar no Brasil

O processo de expansão geográfica da LT no Brasil teve início na década de 80, quando dezenove estados registraram casos da doença; duas décadas posteriores, casos autóctones de LT foram registrados em todas unidades federadas do país (Brasil MS 2006). Segundo estimativas do Ministério da Saúde (MS), no período de 1985 a 2012, verificou-se média anual de 25.426 casos autóctones de LT registrados e coeficiente de detecção médio de

13,1 casos/100.000 habitantes (Brasil MS 2013). Este processo de expansão vem modificando a epidemiologia e os padrões de transmissão da doença, que não mais se restringe a indivíduos que entram em contato com matas e animais silvestres, ocorrendo também em áreas rurais desmatadas e regiões periurbanas (Kawa et al. 2010, Shimabukuro et al. 2010, Bacha et al. 2011, Camara Coelho et al. 2011, Quaresma 2013).

Nesse contexto, em Minas Gerais desde a metade do século passado, quando a doença foi descrita, têm sido registrados surtos de LT relacionados, quase exclusivamente, às atividades de desmatamento (Martins et al. 1956, Dias et al. 1977, Gontijo et al. 2002). Entretanto, a partir da última década, têm sido descritos casos em áreas peri-urbanas de cidades de médio e grande porte (Passos et al. 1993), além daqueles em áreas de colonização antiga (Gontijo et al. 1995). Atualmente, Minas Gerais é um dos Estados brasileiros que apresenta maior número de casos notificados para LT, registrando nos anos de 2008 a 2012: 1160, 1047, 1926, 1746, 1041 casos da doença, respectivamente (Brasil MS 2013).

A LT, assim como outras doenças parasitárias endêmicas, tem sido relacionada à áreas de pobreza e escassos recursos humanos e econômicos para seu controle e profilaxia. Porém, não existe um padrão de transmissão, e cada foco possui particularidades que devem ser avaliadas para que se estabeleçam medidas profiláticas efetivas.

A ocorrência de focos de LC em comunidades indígenas brasileiras têm sido pouco explorada. Os primeiros relatos datam das décadas de cinquenta/sessenta e referem-se a estudos em comunidades do Estado do Mato Grosso (Forattini & dos Santos 1956, de Carneri et al. 1963). Pena & Heller (2008) realizaram um estudo na comunidade indígena Xakriabá (região norte de Minas Gerais, Brasil), demonstrando que os indígenas dessa comunidade vivem em condições sanitárias, de saúde e habitação muito precárias. Elevada prevalência de doenças endêmicas como parasitoses, altas taxas de incidência de diarreia e acentuadas taxas de mortalidade infantil fazem parte do cotidiano desse povo. Para agravar o quadro, têm sido registrados casos autóctones de LC desde 2001, sendo que em 2011 estimativas mostraram uma prevalência de 8,6% casos da doença (Quaresma 2011). Segundo Pena (2004), intervenções na área de saúde estão sendo realizadas sem conhecimento da cultura Xakriabá, e isto poderia estar influenciando o êxito das atividades realizadas na comunidade.

### 3.2 *Formas clínicas da leishmaniose tegumentar*

De acordo com Saraiva et al. (1989), o desenvolvimento da LT é dependente de alguns fatores tais como, espécie de *Leishmania* envolvida e da relação parasito/hospedeiro. Nesse



contexto, Convit & Pinarði (1974) e Convit et al. (1993) descreveram aspectos clínicos, histopatológicos e imunológicos da LT, permitindo a classificação da doença em três formas clínicas: 1) LC, é a forma mais comum, podendo ser causada por qualquer espécie dermatrópica de *Leishmania*. No Brasil é causada, principalmente, pela espécie *L. (V.) braziliensis*, amplamente distribuída em todo país (Brasil MS 2007). Caracteriza-se pela presença de uma ou poucas lesões ulcerosas com poucos parasitos, indolores, com bordas altas e bem delimitadas, e ocorre, na maioria das vezes, em regiões descobertas do corpo (Pessoa & Barreto 1984, Goto & Lindoso 2010). Os pacientes acometidos por essa forma clínica apresentam tendência significativa à cura espontânea das lesões (Costa et al. 1987); 2) Leishmaniose Mucosa (LM), causada principalmente pela espécie *L. (V.) braziliensis*, que acomete mucosas do nariz, boca, laringe e faringe, apresentando lesões graves e destrutivas. Essas lesões podem surgir meses ou anos após cura clínica de lesões cutâneas primárias, por contiguidade ou pela inoculação direta das formas infectantes (Goto & Lindoso 2010); 3) Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) que no Brasil é causada, principalmente, pela espécie *Leishmania (L.) amazonensis*, representando a forma mais rara de LT. Caracteriza-se pela presença de lesões nodulares não ulceradas, que podem distribuir-se por todo corpo, tendo caráter grave, sobretudo pela resistência à terapêutica antimonial (Lainson 1983, Marsden 1986, Goto & Lindoso 2010).

Além disso, Costa et al. (1986) descreveram também outra forma clínica, a Leishmaniose Disseminada (LD). Segundo Turetz et al. (2002), a LD é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões ( $\geq 10$ ) papulares com aparência acneiforme, nodulares e/ou ulceradas que acometem vários segmentos corporais ( $\geq 2$ ), envolvendo com frequência a face e o tronco. As principais espécies causadoras dessa forma clínica são a *L. (V.) braziliensis* e a *L. (L.) amazonensis* (Carvalho et al. 1994, Brasil MS 2007).

### 3.3 Resposta imune na leishmaniose cutânea

A infecção por *Leishmania* inicia-se quando formas promastigotas infectantes são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado, desencadeando uma reação inflamatória local com acúmulo de leucócitos no sítio de infecção (Teixeira et al. 2006, Silveira et al. 2009). Nesse microambiente, aproximadamente 90% dos parasitos são lisados pelo complemento através do complexo de ataque à membrana (C5b-C9) (Domínguez et al. 2002, Domínguez et al. 2003, von Stebut 2007). No entanto, aqueles parasitos não destruídos podem se ligar a

receptores específicos na superfície de fagócitos e serem internalizados por um processo denominado fagocitose (Mosser & Rosenthal 1993, von Stebut 2007, Peters et al. 2008).

A interação inicial promastigotas-macrófagos é fundamental para o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado (Rosenthal et al. 1996, von Stebut 2007). Nesse contexto, diversos estudos já demonstraram a importância de determinados receptores no processo de reconhecimento/adesão: receptores manose-fucose e fibronectina, receptor para glicosilação avançada, bem como receptores Fc $\gamma$  e do complemento (Mosser & Edelson 1985, Mosser & Handman 1992, Mosser, Springer & Diamond 1992, Guy & Belosevic 1993). Segundo alguns autores, a opsonização através do terceiro componente do complemento (C3) promove aumento significativo da capacidade fagocítica de macrófagos (Mosser & Edelson 1985, Mosser, Springer & Diamond 1992, von Stebut 2007). Mosser & Edelson (1987) observaram também que a incorporação de C3 à promastigotas de *L. major* aumenta drasticamente a sobrevivência do parasito dentro dessas células.

Outro grupo de receptores com destaque no reconhecimento de patógenos são os Receptores de Reconhecimento Padrão (PPRs). Os PPRs são constituídos por vários membros, incluindo os receptores do tipo *Toll* (TLRs) que reconhecem patógenos distintos associados a padrões moleculares (PAMPs) (Janssens and Beyaert 2003a). Os TLRs estão envolvidos em uma variedade de fenômenos celulares, dentre eles pode-se destacar: fagocitose, maturação, atividade microbicida do fagossoma via indução da expressão de iNOS, bem como produção de citocinas moduladoras e pró-inflamatórias (Singh, Srivastava & Singh 2012).

Além disso, já foi demonstrado que a *Leishmania* possui diversos mecanismos de escape para evadir da resposta imune do hospedeiro e estabelecer a infecção. Dentre esses mecanismos, alguns podem ser destacados: 1) Inibição da produção da citocina inflamatória interleucina (IL)-12 (Belkaid, Butcher & Sacks 1998); 2) Degradação da molécula de ativação HLA-DR em macrófagos infectados (de Souza-Leao et al. 1995); 3) Inibição da ação do complemento, através da expressão de proteínas quinases que fosforilam os componentes C3, C5 e C9 (von Stebut 2007).

O estabelecimento e evolução das lesões causadas pela infecção por *L. (V.) braziliensis* são altamente dependentes da imunidade celular (Pirmez et al. 1993, Da-Cruz et al. 1994, Coutinho et al. 1996, Baratta-Masini et al. 2007, Freitas-Teixeira et al. 2012). Sendo assim, diversos estudos realizados em modelos experimentais têm elucidado o papel da resposta imune celular no desenvolvimento dos perfis de resistência e suscetibilidade à infecção causada por *Leishmania* (Locksley et al. 1987, Scott 1989, Sadick et al. 1990,

Locksley & Scott 1991, Monteforte et al. 2000). Existem evidências que o padrão de resistência observado na infecção por *L. major*, em camundongos, esteja associado à *resposta Tipo 1* com ativação e diferenciação seletiva de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Por outro lado, o padrão de suscetibilidade tem sido relacionado à *resposta Tipo 2* com ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores, principalmente, de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4 (Sacks & Noben-Trauth 2002, Awasthi, Mathur & Saha 2004, Mougneau et al. 2011, Kaye & Scott 2011).

Entretanto, essa clara dicotomia Tipo 1/Tipo 2 observada em modelo murino não está bem estabelecida na infecção humana, onde os mecanismos imunológicos envolvidos no estabelecimento e evolução da infecção são muito mais complexos (Castellano et al. 2009). Sendo assim, alguns estudos têm se concentrado na determinação de aspectos importantes da resposta imune na LC humana, tais como: perfil imunológico associado à lesão ativa, à resistência natural à doença, bem como à cura espontânea e pós-tratamento (Carvalho et al. 1995, Da-cruz et al. 2002, Follador et al. 2002, Ritter & Korner 2002, Baratta-Masini et al. 2007, Campanelli et al. 2010, Costa-Silva et al. 2013).

A LC humana causada por *L. (V.) braziliensis* é caracterizada por acentuada resposta celular e poucos parasitos são observados nas lesões ativas. O infiltrado inflamatório é composto, predominantemente, por macrófagos, linfócitos T e B, bem como células plasmáticas (Carvalho et al. 2012, Santos et al. 2013). De acordo com alguns autores, a composição celular do infiltrado inflamatório é fundamental para definir a evolução da doença. Nesse contexto, as quimiocinas têm papel de destaque, promovendo migração e/ou ativação celular no sítio da infecção (Teixeira et al. 2006). Segundo Ritter & Korner (2002), lesões de pacientes portadores de LC apresentam maiores níveis de expressão de quimiocinas relacionadas à *resposta Tipo 1*, como CCL2, CXCL9 e CXCL10 e menores de CCL3. Por outro lado, na LCD que apresenta caráter crônico associado à *resposta Tipo 2*, foi observado perfil imunológico oposto com maior expressão de CCL3 e menor de CCL2, CXCL9 e CXCL10. Além disso, quimiocinas e citocinas podem atuar de forma sinérgica, favorecendo a progressão ou controle da infecção. Campanelli et al. (2006, 2010), sugeriram que a expressão da quimiocina CCL17 em lesões de pacientes portadores de LC poderia atrair células CCR3<sup>+</sup> e CCR4<sup>+</sup> ao foco inflamatório, levando à produção de IL-10 e TGF- $\beta$  e controle da reação inflamatória. Por outro lado, foi observado que macrófagos humanos infectados por *Leishmania major* secretam CCL2, atraindo células CCR2<sup>+</sup> (células NK) ao foco inflamatório. No sítio da infecção essas células secretam IFN- $\gamma$ , contribuindo para eliminação do parasito (Ritter & Moll 2000, Ritter & Korner 2002). Nesse contexto, diferentes padrões de

distribuição de subpopulações de linfócitos T têm sido descritos em lesões ativas de pacientes portadores de LC:  $CD4^+ > CD8^+$  (Barral et al. 1987, Pirmez et al. 1990),  $CD4^+ = CD8^+$  (Lima et al. 1994) e  $CD4^+ < CD8^+$  (Vieira et al. 2002). Recentemente, Santos et al. (2013) demonstraram que essas duas subpopulações celulares apresentam papel dicotômico na LC humana: linfócitos T  $CD4^+IFN-\gamma^+$  foram associados à destruição do parasito e linfócitos T  $CD8^+ Granzima B^+$  a maior dano tecidual.

Vários estudos têm demonstrado a influência do tempo de evolução da lesão no perfil imunológico de pacientes portadores de LC (Melby et al. 1994, Baratta-Masini et al. 2007, Campanelli et al. 2010). Sendo assim, Rocha et al. (1999) demonstraram, durante a fase inicial da infecção (< 60 dias), maior produção de IL-10 e menor de IFN- $\gamma$ , sugerindo que esse microambiente poderia modular a *resposta Tipo 1*, facilitando a proliferação da *L. (V.) braziliensis*. Além disso, nosso grupo observou que pacientes com lesões recentes (< 60 dias) apresentaram maior número de linfócitos T IL-10<sup>+</sup> e IL-4<sup>+</sup> em relação àqueles portadores de lesões mais tardias (> 60 dias) (Baratta-Masini et al. 2007). A citocina IL-10 está associada a diversos mecanismos imunomoduladores na LC: persistência parasitária, regulação da expansão de células da *resposta Tipo 2*, assim como modulação de células inflamatórias envolvidas no desenvolvimento da lesão (Carvalho et al. 2012). Em outro estudo, Coutinho et al. (1998) observaram após terapêutica específica menores níveis de IL-4 em relação à fase ativa da infecção, indicando provável papel dessa citocina na progressão da doença. Recentemente, Costa-Silva et al. (2013) mostraram que lesões recentes de pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* apresentaram, além de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4, maior expressão das citocinas inflamatórias IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em relação às lesões tardias.

De acordo com alguns autores, a produção das citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  poderia promover controle da disseminação parasitária e resolução da infecção (Green et al. 1990, Díaz et al. 2003, Horta et al. 2012), no entanto uma *resposta Tipo 1* exacerbada tem sido associada a maior dano tecidual (Bacellar et al. 2002, Faria et al. 2005, Carvalho et al. 2007). Várias evidências têm demonstrado o papel imunopatológico de TNF- $\alpha$  na LC e LM: 1) Antonelli et al. (2005) observaram correlação positiva entre o diâmetro da lesão e os níveis de TNF- $\alpha$  em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com LC estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania*; 2) Da-Cruz et al. (2002), verificaram que pacientes portadores de LC e LM apresentaram queda dos níveis dessa citocina após quimioterapia; 3) Pacientes tratados com antimonial pentavalente associado à pentoxifilina, um inibidor de TNF- $\alpha$ , apresentam maior taxa de cura em relação aqueles tratados apenas com o antimonial pentavalente (Lessa et al. 2001, Carvalho et al. 2012). Além

disso, diversos estudos têm tentado elucidar o papel da citocina inflamatória IL-17 em infecções parasitárias intracelulares. Em modelo experimental susceptível à infecção por *L. major*, os autores observaram que na ausência dessa citocina as lesões foram menores (Kostka et al. 2009). Por outro lado, em outro modelo experimental, Vargas-Inchaustegui et al. (2008) demonstraram que a auto-resolução das lesões de camundongos C57BL/6 infectados por *L. (V.) braziliensis* foi associada à presença de IL-17. Na infecção humana, IL-17 tem sido observada em lesões e culturas de PBMC estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* de pacientes portadores de LC e LM (Bacellar et al. 2009, Boaventura et al. 2010). Entretanto, o papel dessa citocina na patogênese da doença humana ainda permanece indefinido.

Diante do exposto, alguns autores têm associado à resolução das lesões na LC à redução de IL-4, IL-5 e TNF- $\alpha$  (Coutinho et al. 1996, Da-Cruz et al. 1996, Ribeiro-de-Jesus et al. 1998) e manutenção dos níveis de IFN- $\gamma$  após tratamento específico (Da-Cruz et al. 2002). Por outro lado, acredita-se que o grau de severidade da doença esteja correlacionado à resistência dos parasitos aos mecanismos leishmanicidas (Giudice et al. 2007, Carvalho et al. 2012).

De acordo com Oliveira-Neto et al. (2000), a maior parte dos pacientes portadores de LT desenvolvem a forma clínica cutânea. Entretanto, aproximadamente 10% dos indivíduos residentes em área endêmica apresentam Teste intradérmico de Montenegro (TM) positivo sem história prévia ou lesão sugestiva de LC, sendo caracterizados como subclínicos ou assintomáticos (Marzochi et al. 1980, Souza et al. 1992, Davies et al. 1995, Bosque et al. 2000, Follador et al. 2002, Baratta-Masini et al. 2007). Nesse contexto, nosso grupo realizou um inquérito epidemiológico na comunidade indígena Xakriabá, demonstrando que 19% dos indivíduos apresentavam TM positivo na ausência de lesões ou cicatrizes (Quaresma 2011).

Até o presente momento, os fatores associados ao controle da infecção subclínica ou assintomática ainda não são bem compreendidos. Segundo Bosque et al. (2000), macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de indivíduos subclínicos ou assintomáticos são menos permissivos à entrada de promastigotas de *Leishmania (V.) panamensis* em relação a macrófagos de pacientes com LC recorrente. Além disso, Bittar et al. (2007) sugeriram que esses indivíduos desenvolvem uma resposta imune balanceada com mecanismos imunomoduladores e efetores capazes de controlar a replicação do parasito e manter à integridade do tecido. Follador et al. (2002), demonstraram que indivíduos subclínicos ou assintomáticos apresentaram níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  mais baixos e níveis de IL-5 mais elevados quando comparados a pacientes que apresentavam lesão ativa. Os autores acreditam que esse perfil de citocinas poderia modular a resposta imunológica, diminuindo a reação

inflamatória e, conseqüentemente, o surgimento da lesão. Mais recentemente em um estudo realizado por nosso grupo, Baratta-Masini et al. (2007) demonstraram perfil de citocinas do *Tipo 0*, com níveis de produção basal em indivíduos considerados resistentes. Contudo, esses indivíduos também apresentaram menor frequência de linfócitos T IL-4<sup>+</sup>, elevada razão entre células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup> e altos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato, sugerindo que a despeito dos níveis basais de citocinas, a maior proporção de citocinas do *Tipo 1* em relação às do *Tipo 2* contribuiria para prevenir o crescimento dos parasitos e o desenvolvimento de lesões.

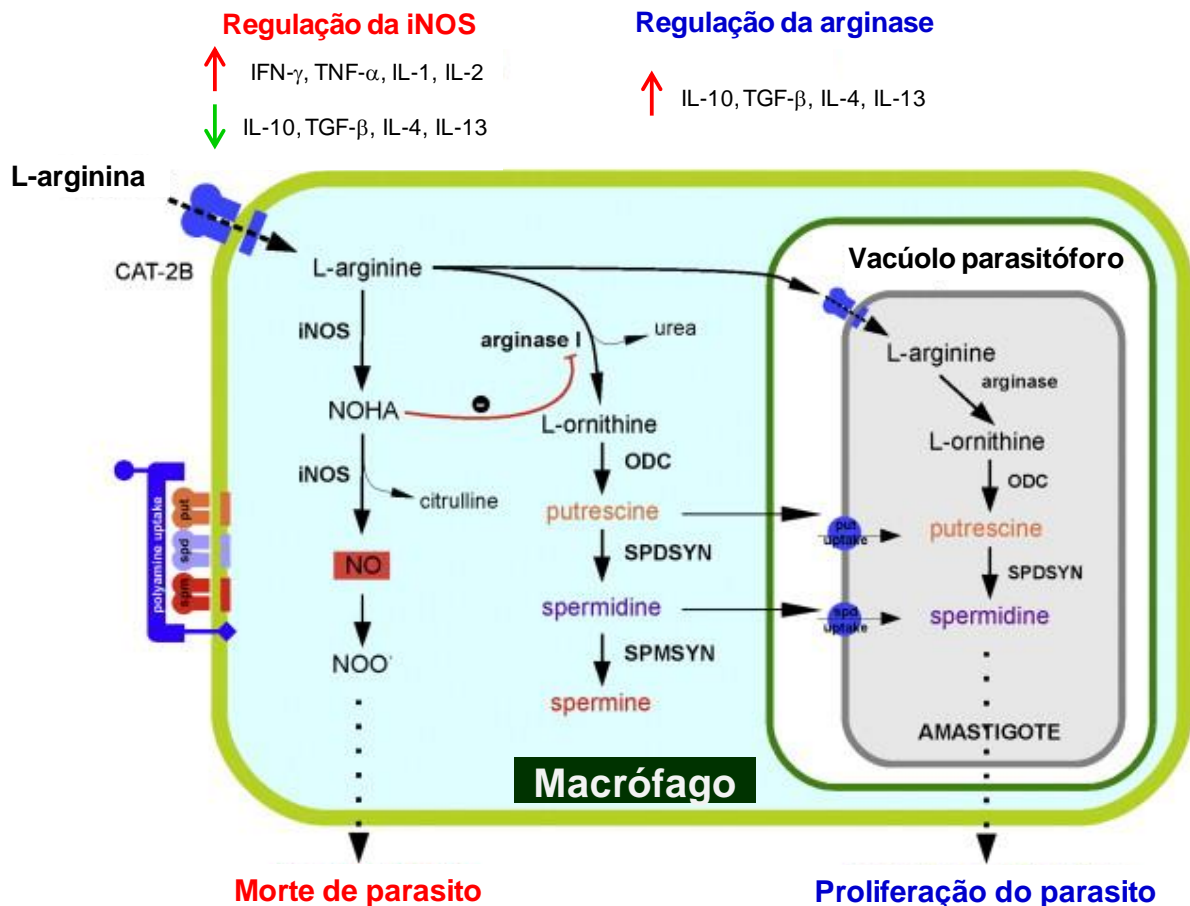
### 3.4 O óxido nítrico e a infecção por *Leishmania*

O óxido nítrico (NO) é gerado a partir da oxidação do nitrogênio guanidino da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase que pode ser expressa constitutivamente (NOS-3, ecNOS, NOS III) ou induzida (iNOS, NOS II) (Nathan & Xie 1994).

A L-arginina está envolvida em diversas vias metabólicas, no entanto duas dessas vias são extremamente relevantes na infecção por *Leishmania*, uma vez que são responsáveis por regular funções efetoras dos macrófagos (Morris 2004, Wanasen & Soong 2008). De acordo com o estímulo extracelular, a L-arginina pode ser catabolizada pela iNOS, promovendo a produção de NO ou pela arginase, favorecendo a síntese de poliaminas. Nesse contexto, quando macrófagos são ativados por citocinas da *resposta Tipo 1*, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , bem como estimulados por moléculas que se ligam a receptores do tipo *Toll*, como lipopolissacarídeo (LPS), ocorre aumento da expressão da enzima iNOS, direcionando o metabolismo da L-arginina para síntese de NO e eliminação do parasito (Green et al. 1990, Liew et al. 1991, Wanasen & Soong 2008, Horta et al. 2012). Além disso, foi demonstrado também que diversas quimiocinas, com destaque para CCL2, CCL3 (Bhattacharyya et al. 2002, Brandonisio et al. 2002), e CXCL10 (Vasquez & Soong 2006), podem aumentar a atividade da enzima iNOS e contribuir para morte da *Leishmania*.

Por outro lado, citocinas da *resposta Tipo 2* (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13), preferencialmente induzem o metabolismo da L-arginina para síntese de poliaminas (Iniesta et al. 2002, Barksdale et al. 2004). Essas citocinas promovem aumento da expressão e atividade da enzima arginase que converte L-arginina em L-ornitina, dando origem, posteriormente, por ação da ornitina descarboxilase, às poliaminas (Wanasen & Soong 2008). Segundo alguns autores, as poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) são nutrientes importantes para o desenvolvimento da *Leishmania*, sugerindo que citocinas *Tipo 2* podem, além de inibir mecanismos imunológicos do hospedeiro, favorecer o crescimento do parasito (Iniesta et al.

2002, Kane & Mosser 2001). A Figura 1 ilustra esquematicamente vias metabólicas da L-arginina na LC.



**Figura 1:** Vias metabólicas da L-arginina na leishmaniose cutânea. O metabolismo da L-arginina desempenha papel-chave na ativação de macrófagos e sobrevivência da *Leishmania*. A ativação clássica de macrófagos por citocinas da *resposta Tipo 1* (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2) induz maior atividade da enzima iNOS e produção de NO e citrulina. A síntese de NO leva à formação de reativos de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NROS) e eliminação do parasito. A ativação alternativa de macrófagos por citocinas da *resposta Tipo 2* (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13) promove maior atividade da enzima arginase, resultando na síntese de poliaminas (putrescina, espermidina e, espermina). As poliaminas são utilizadas como nutrientes pelas formas amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo, contribuindo para o crescimento do parasito e proliferação da infecção (Fonte: Balaña-Fouce et al. 2012).

### 3.5 Diagnóstico da leishmaniose cutânea

O diagnóstico da LC é baseado em aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, sendo os exames parasitológicos, por sua alta especificidade, definidores de diagnóstico. Nesse contexto, o teste mais utilizado é a visualização por microscopia ótica de formas amastigotas do parasito em espécimes corados por Giemsa, obtidos por raspado ou biópsia das lesões (Reithinger et al. 2007, Goto & Lindoso 2010). Entretanto, a eficácia desse método

depende do tempo de evolução da lesão, bem como da espécie de *Leishmania* e treinamento do microscopista, apresentando sensibilidade muito variável. (Pirmez et al. 1999, Marques et al. 2006, Reithinger & Dujardin 2007). O estudo histopatológico através da coloração pela hematoxilina e eosina (H&E) permite visualização do parasito em aproximadamente 60% dos casos (Magalhães et al. 1986a). Além disso, fragmentos de tecido provenientes de lesões podem ser inoculados em meio específico, permitindo o isolamento do parasito para futuros ensaios de identificação de espécie ou estudos de resistência a drogas (Romero et al. 1999, Reithinger & Dujardin 2007).

O TM é um teste imunológico de hipersensibilidade tardia que avalia a resposta imune celular pela medida de endureção da pele 48 a 72 horas após a injeção de antígeno padronizado na face volar do antebraço. O resultado do teste é influenciado pelo estado imunológico do indivíduo, tempo de evolução da lesão, espécie de *Leishmania* infectante e pelo antígeno empregado. O resultado positivo pode significar infecção subclínica ou assintomática, infecção passada ou doença ativa (Weigle et al. 1991, Davies et al. 1995, Follador et al. 2002, Reithinger & Dujardin 2007).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método molecular que vem sendo utilizado para fins de pesquisa no diagnóstico da leishmaniose, uma vez que é altamente sensível e específico, independente da espécie de *Leishmania*. Além disso, o método tem apresentado melhor desempenho em relação à microscopia ou cultivo do parasito, principalmente, em situações onde os parasitos são escassos, como lesões de pacientes portadores de LM (Garcia et al. 2005, Reithinger & Dujardin 2007). A PCR em Tempo Real (RT-PCR) é uma metodologia relativamente recente na área do diagnóstico e emprega marcadores fluorescentes para monitoramento contínuo da amplificação, ou seja, do produto de PCR formado através da reação. Dentre as vantagens desse método destacam-se, tempo curto de processamento das amostras, facilidade de execução, menor risco de contaminação por DNA amplificado e elevada especificidade (Wortmann et al. 2005). Dessa forma, a RT-PCR tem sido utilizada para detecção, identificação e quantificação da carga parasitária na leishmaniose (Kumar, Bumb & Salotra 2009, Pita-Pereira et al. 2012, de Almeida Ferreira et al. 2012, Gomes et al. 2012, Jara et al. 2013).



### 3.6 *Tratamento da leishmaniose cutânea*

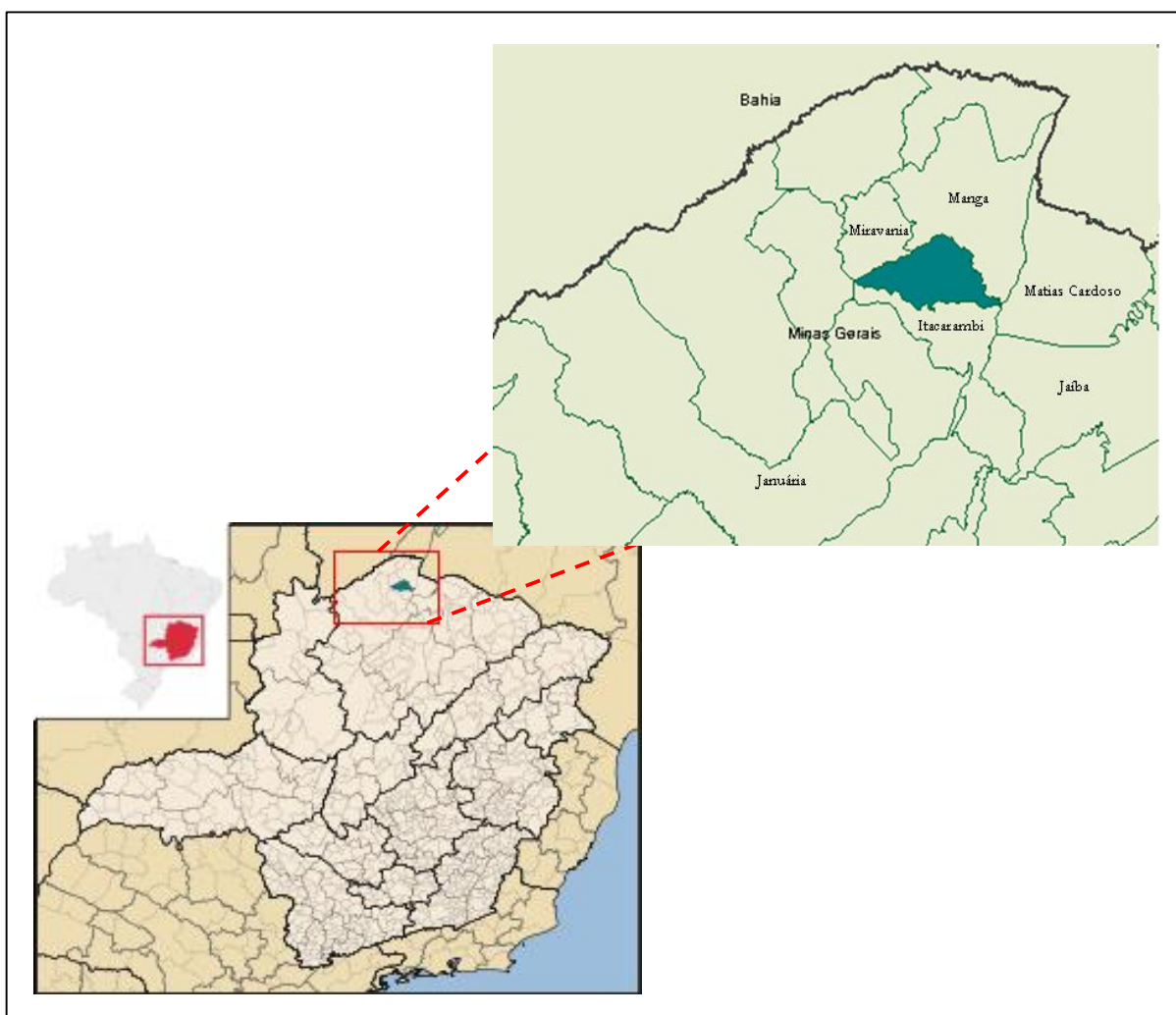
Atualmente, o tratamento da LC baseia-se, principalmente, na quimioterapia. O medicamento de primeira escolha adotado pelo Ministério da Saúde brasileiro e pela maioria dos países, onde a LC é endêmica, é o Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido. De acordo com Berman (1988), é possível que a droga atue nas formas amastigotas do parasito, inibindo atividade glicolítica e via oxidativa de ácidos graxos. Para tratamento da forma cutânea, é recomendada a via injetável intra-muscular ou endovenosa, na dose de 10 a 20 mg/Kg por dia, durante 20 dias (Brasil MS 2007). Entretanto, a toxicidade desse medicamento leva a efeitos adversos potencialmente graves e fatais (Sampaio et al. 1997, Oliveira et al. 2005), impedindo seu emprego em pacientes com doenças pré-existentes, além de exigir monitoramento cuidadoso de diversas funções orgânicas (Herwaldt & Bermam 1992). Seus principais efeitos tóxicos são arritmias cardíacas, disfunções renal, hepática e pancreática (Sampaio et al.1997, Oliveira-Neto et al. 2000). Dessa forma, pacientes que apresentam contra-indicações ao Antimoniato de N-metilglucamina ou recidivas são tratados com Pentamidina ou Anfotericina B (Rocha et al. 1980, Ameen 2010).

## **4 POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS**

4.1 Descrição da área estudada

Os indivíduos avaliados nesse estudo residem na comunidade indígena Xakriabá, demarcada pela Fundação Nacional do Índio (FUNAI) em 1979 e localizada no município de São João das Missões, na região norte do Estado de Minas Gerais, Brasil.

O município de São João das Missões está situado na zona do alto Médio São Francisco, micro região do Vale do Peruaçu e limita-se com os municípios de Miravânia, Manga e Itacarambi. A região é banhada pelo rio Itacarambi e possui clima tropical úmido de savanas com inverno seco, em transição para clima quente e seco, com chuvas de verão. O tipo de vegetação predominante é o cerrado com áreas mescladas de caatinga ao centro-oeste (IBGE 2006) - Figura 2.



**Figura 2:** Localização geográfica do município de São João das Missões, Minas Gerais, Brasil, destacando-se em verde a região ocupada pela Comunidade Indígena Xakriabá (Fonte: IBGE 2006).

A população de São João das Missões é composta por aproximadamente 12.489 habitantes, sendo predominantemente rural (79,58%). A comunidade indígena ocupa uma área de 530,74 Km<sup>2</sup>, correspondente a 78,07% da superfície total do município. É constituída por 32 aldeias, formando 5 pólos base com população total estimada em 8.380 habitantes (Figura 3) (FUNASA 2010). A comunidade indígena foi selecionada para o estudo devido ao grande número de casos de leishmaniose cutânea registrados nos últimos anos. No período de 2010 a 2012 foram registrados 33, 61, 51, respectivamente (Brasil MS/FUNASA 2013).



**Figura 3:** Vista panorâmica da comunidade indígena Xakriabá, localizada na região norte do estado de Minas Gerais, Brasil (Fonte: Helbert Botelho).

### 4.2 Procedimentos éticos

A participação dos indivíduos no estudo foi condicionada à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos participantes ou seus responsáveis legais, no caso de crianças e menores de 18 anos. Além disso, o trabalho foi realizado em concordância com as resoluções n.º. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde e n.º. 304/2000 que regulamentam pesquisa em seres humanos e populações indígenas,

respectivamente; mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ (CEPSH/CPqRR n.º. 021/2007) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP: 14689). Além disso, o estudo possui também licença fornecida pela FUNAI (n.º. 149/CGEP/08), pelo fato de ser realizado em uma comunidade indígena.

É importante mencionar que todos os casos clínicos detectados durante o estudo receberam assistência adequada, com diagnóstico e tratamento (Antimoniato de N-metilglucamina/Glucantime® - 20mg/Kg por dia durante 20 dias), independente de terem sido alocados para os propósitos da presente investigação.

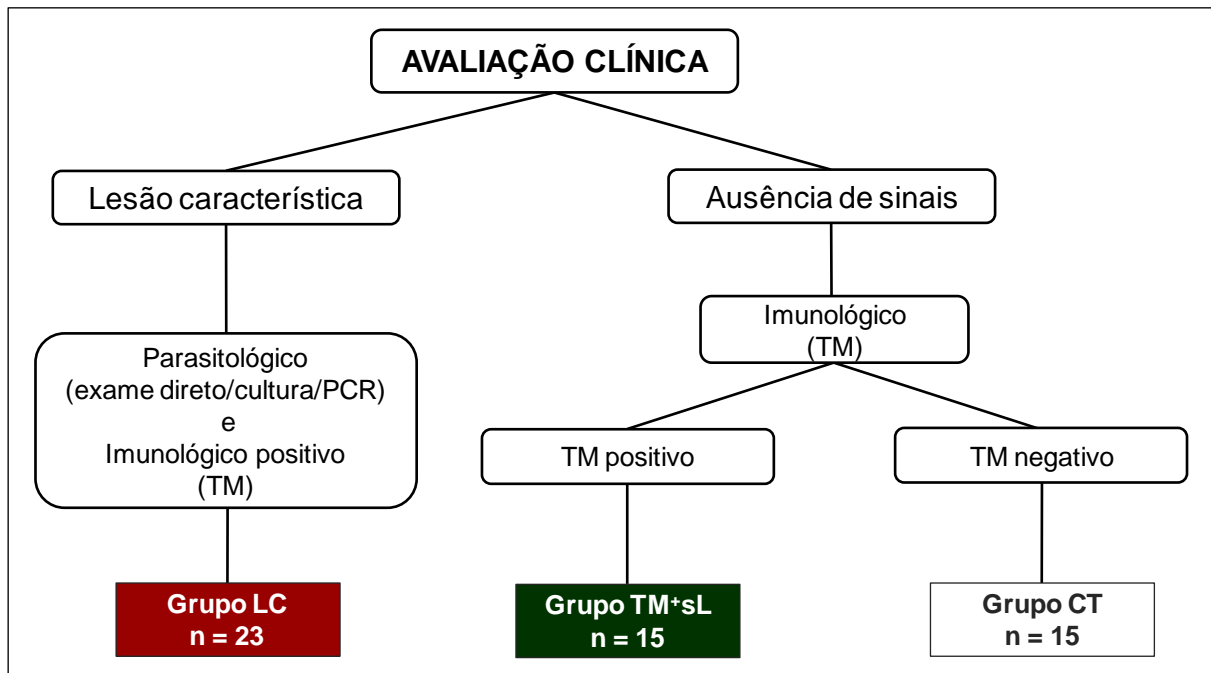
### 4.3 Caracterização da população avaliada

Para realização do presente trabalho utilizou-se uma “*amostra de conveniência*” definida pela disponibilidade de amostras e exequibilidade do estudo. Nesse contexto, considerando o número mensal de casos confirmados pela equipe do projeto e as abordagens estatísticas propostas para análise dos dados (coordenadas pela epidemiologista Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Castro Moreno da FUNASA/HEMOMINAS), cinquenta e três indivíduos foram avaliados. Inicialmente, realizou-se o TM em todos participantes do estudo no local de domicílio. Posteriormente, eles foram convocados a comparecer ao Posto de Saúde mais próximo, 48 horas após a realização do TM, para leitura do teste e realização de exame clínico e, se necessário, realização de aspirado/biópsia da lesão pelo médico responsável. Dessa forma, pacientes portadores de leishmaniose cutânea (grupo LC) foram definidos como aqueles com lesão característica associada à confirmação parasitológica (exame direto/“imprint” e/ou cultivo de aspirado/biópsia da lesão e/ou reação em cadeia da polimerase - PCR positivos) e TM positivo. É importante mencionar que a associação de técnicas bioquímicas e moleculares para identificação da espécie de *Leishmania* (Cupolillo et al. 1994, Garcia et al. 2004), demonstrou que todos pacientes do grupo LC estavam infectados pela espécie *Leishmania (V.) braziliensis*.

Além disso, dois outros grupos compuseram a população avaliada: indígenas com TM positivo na ausência de lesões ou cicatrizes (grupo TM<sup>+</sup>sL) e sem sinais sugestivos de LC e indígenas com TM negativo na ausência de lesões ou cicatrizes e sem sinais sugestivos de LC (grupo CT) - Figura 4.

Posteriormente, os resultados foram encaminhados para o setor médico responsável, onde os casos clínicos detectados receberam tratamento e acompanhamento adequados. Essa

parte do estudo foi realizada e coordenada pela médica infectologista do projeto Dr<sup>a</sup>. Janaína de Moura Freire do Centro de Pesquisa René Rachou.



**Figura 4:** Desenho esquemático, ilustrando procedimentos realizados para classificação da população avaliada. Após realização dos exames diagnósticos, a população estudada foi categorizada em três diferentes grupos: grupo com leishmaniose cutânea (LC), grupo com Teste intradérmico de Montenegro positivo sem lesão (TM+sL) e grupo controle (CT).

#### 4.3.1 Critérios de inclusão

Após realização dos exames diagnósticos, os indivíduos foram selecionados de acordo com os seguintes critérios:

- Conclusão dos exames propostos;
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo voluntário ou responsável.

#### 4.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo todos indivíduos que não preencheram os critérios de inclusão definidos acima ou que apresentaram:

- Qualquer doença sistêmica significativa crônica ou aguda que pudesse interferir nos resultados dos métodos propostos;

- Diagnóstico conhecido de infecção por HIV ou outras imunodeficiências ou uso de imunossupressores;
- Uso de medicação tópica sobre a lesão cutânea e uso prévio de leishmanicidas;
- Alcoolismo, definido como consumo médio semanal acima de 420 g de etanol (média diária acima de 60 g de etanol) (Skinner et al. 1984);
- Gravidez, definida por critérios laboratoriais;
- Anemia significativa, definida como hemoglobina menor que 10 g/dL (Stoltzfus & Dreyfuss 1998).

Para a realização desse estudo, cinquenta e três indivíduos foram avaliados, sendo quinze do grupo controle (08 mulheres e 07 homens) com idade variando de 14 a 52 anos ( $\bar{x}$  de idade  $27,1 \pm 10,4$  e mediana 27,0); quinze do grupo TM<sup>+</sup>sL (07 mulheres e 08 homens) com idade variando de 12 a 63 anos ( $\bar{x}$  de idade  $33,3 \pm 18,1$  e mediana 29,0); vinte e três do grupo LC (08 mulheres e 15 homens) com idade variando de 07 a 45 anos ( $\bar{x}$  de idade  $22,3 \pm 11,1$  e mediana 21,0) - Tabela 1.

**Tabela 1:** Caracterização da população avaliada

GRUPOS	Siglas	Varição idade (anos)	Média de idade (anos)	Mediana (anos)	Fem.	Masc.	TOTAL
Indivíduos não infectados	CT	14 - 52	$27,1 \pm 10,4$	27,0	08	07	15
TM positivo sem lesão	TM <sup>+</sup> sL	12 - 63	$33,3 \pm 18,1$	29,0	07	08	15
Pacientes com LC	LC	07 - 45	$22,3 \pm 11,1$	21,0	08	15	23

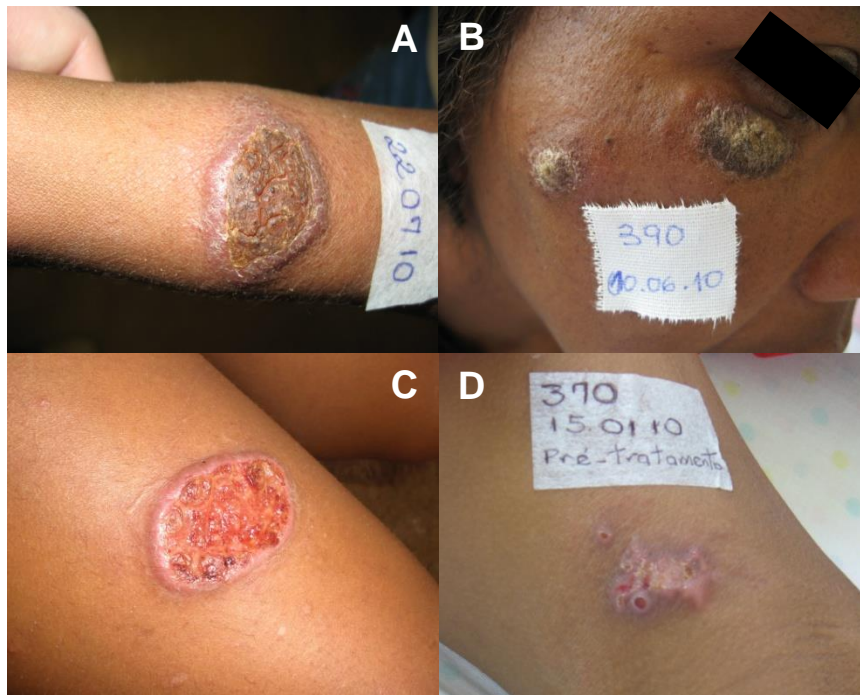
Média de idade  $\pm$  desvio padrão.

Abreviações: LC - Leishmaniose cutânea; TM - Teste intradérmico de Montenegro; Fem. - gênero feminino; Masc. - gênero masculino.

Os pacientes do grupo LC foram categorizados em dois grupos, de acordo com o tempo de evolução da lesão que variou de 01 a 49 meses: grupo **lesão recente** aqueles com lesões  $\leq 3$  meses de evolução (02 mulheres e 05 homens) e grupo **lesão tardia** aqueles com lesões  $> 3$  meses de evolução (06 mulheres e 10 homens) (Melby et al. 1994, Rocha et al. 1999, Baratta-Masini et al. 2007, Campanelli et al. 2010, Freitas-Teixeira et al. 2012, Hejazi et al. 2012, Jara et al. 2013).

Além disso, dos vinte e três pacientes do grupo LC doze apresentaram uma lesão e onze mais que uma lesão. Em relação ao tipo de lesão, dez apresentaram lesões típicas e treze

apresentaram lesões atípicas, de acordo com critérios previamente descritos (Brasil MS 2006, Brasil MS 2007, Guimarães et al. 2009).



**Figura 5:** Caracterização das lesões dos pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC) da comunidade indígena Xakriabá. A Figura **5A** representa um paciente com apenas uma lesão do tipo úlcero-crostosa. **5B** representa um paciente com duas lesões vegetantes. **5C** representa um paciente com lesão típica em forma de úlcera ovalada de base eritematosa, infiltrada com fundo avermelhado e bordas bem delimitadas e elevadas. **5D** representa um paciente com lesão atípica em forma de placa ulcerada (Fonte: Patrícia Quaresma).

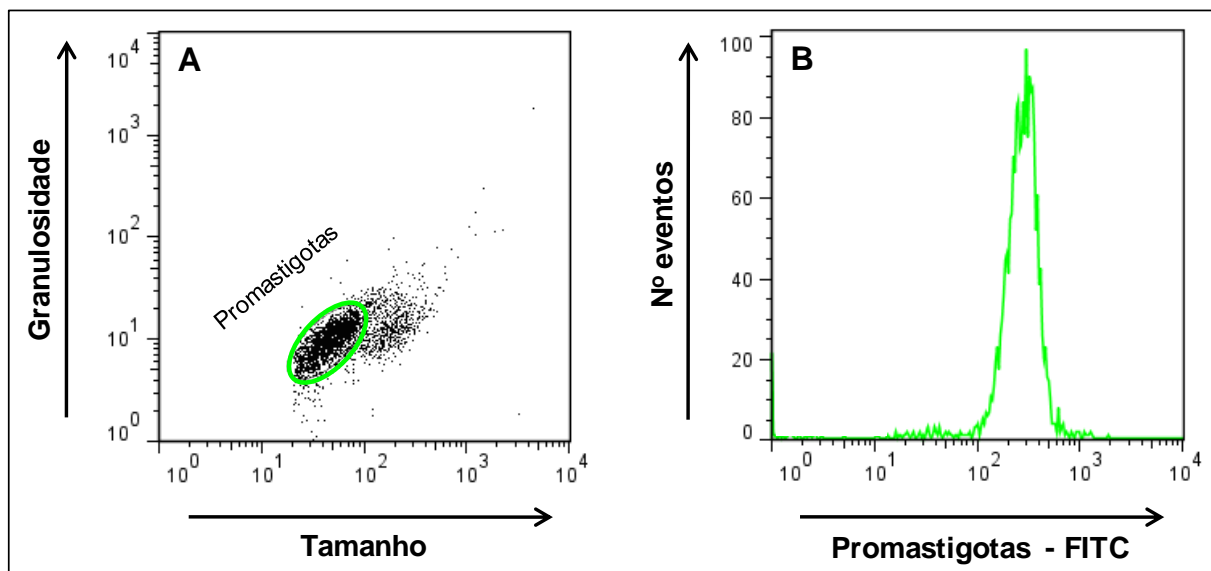
#### 4.4 Obtenção de formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* e marcação com Isotiocianato de fluoresceína (FITC)

As formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1986/MSS), foram obtidas a partir de cultivos em erlenmeyers contendo 30 mL de meio líquido complexo LIT suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) por 7 dias (final da fase estacionária de crescimento), em estufa B.O.D a temperatura de 26°C (Sadigursky & Brodskyn 1986, Schuster & Sullivan 2002). Os parasitos foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno de 50 mL (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.) e a suspensão foi submetida à centrifugação diferencial a 10 x g (Centrífuga Beckman, Modelo J-6B, E.U.A.) durante 10 minutos a temperatura ambiente, para remoção de contaminantes como eritrócitos e grumos de parasitos no sedimento. Os parasitos foram recuperados após um período de repouso de 30 minutos em estufa B.O.D a temperatura de 26°C. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico de polipropileno de 50 mL e o sedimento foi desprezado.



Em seguida, adicionou-se 20 mL de tampão fosfato salino (PBS) 0,015M, pH 7,4 (SIGMA, E.U.A.) - PBS 1X suplementado com 10% de SFB, homogeneizou-se com movimentos circulares e a suspensão celular foi centrifugada a 357 x g, durante 7 minutos a 18°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensionado cuidadosamente. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de PBS 1X suplementado com 10% de SFB, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e a suspensão ajustada para  $1 \times 10^8$  promastigotas/mL.

Para marcação das leishmanias, inicialmente quantidades equivalentes de parasitos vivos e da preparação do fluorocromo FITC 200  $\mu\text{g/mL}$  (Fluorescein Isothiocyanate, Isômero I -  $\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{S}$ ) foram incubados por 30 minutos em estufa B.O.D a temperatura de 26°C. Após incubação com FITC, os parasitos foram lavados por centrifugação a 357 x g, durante 10 minutos a 18°C com PBS 1X. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão foi ressuspensionada em PBS 1X para um volume adequado de parasitos, ou seja, levando-se em consideração o número de amostras a serem testadas e a relação parasito/célula previamente estabelecida (0,5/1). Posteriormente, características morfométricas e a intensidade de fluorescência dos parasitos foram avaliadas em citômetro de fluxo em histograma de fluorescência 1 (FITC) x número de parasitos (Figura 6).



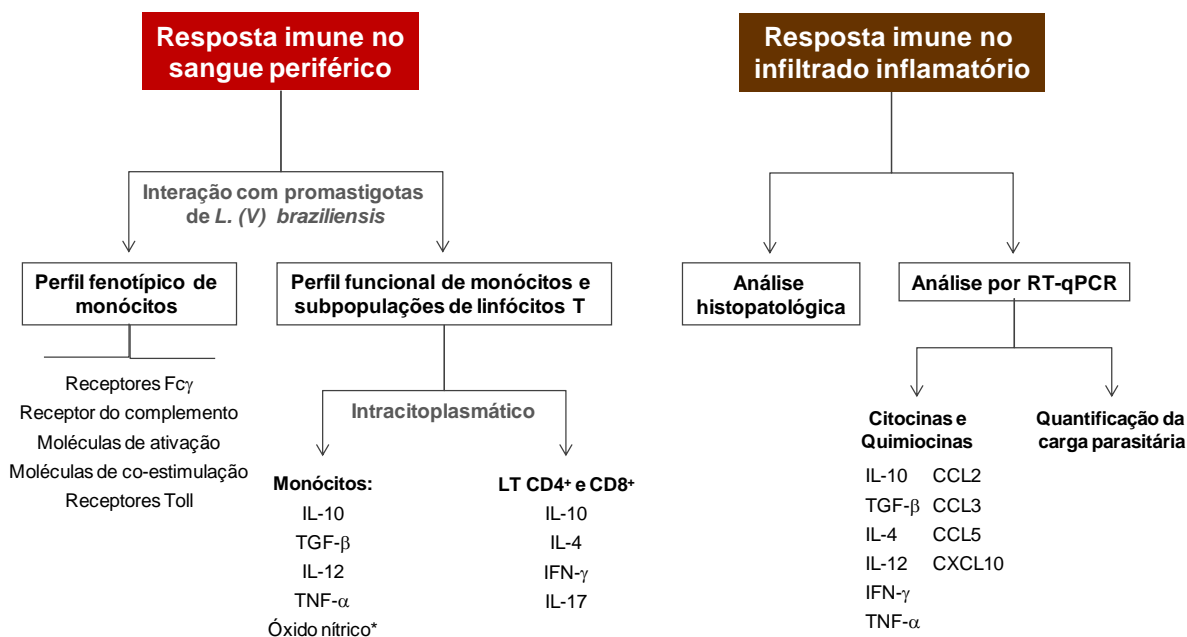
**Figura 6:** Esquema ilustrativo da seleção e marcação de formas promastigotas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis*. A figura 6A representa o perfil de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, selecionadas na janela “gate Promastigotas” em gráfico de distribuição pontual de tamanho versus granulidade. A figura 6B representa a intensidade média de fluorescência apresentada pelos parasitos após a marcação com FITC em gráfico de histograma.

### 4.5 Preparação e obtenção de antígeno solúvel de *Leishmania (V.) braziliensis* (LSA)

As formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1986/MSS) foram cultivadas conforme descrito no item 4.4 da metodologia. Após cultivo, verificou-se a viabilidade das leishmanias pela técnica de “azul de Tripán”, e também presença de agentes contaminantes. Em seguida, os parasitos foram recuperados por centrifugação a 800 x g, durante 10 minutos a 18°C e submetidos a duas lavagens com PBS 1X. Posteriormente, foi realizado o ajuste da concentração celular para aproximadamente 10<sup>8</sup> parasitos/mL. Para obtenção do LSA, os parasitos foram submetidos a três processos de congelamento (-70°C) e descongelamento (37°C), intercalados com processos de homogeneização por 30 segundos, utilizando-se homogeneizador de tecido com pistão de teflon (Wirtis, DT). Posteriormente, o lisado de parasitos foi centrifugado a 37.000 x g, durante 90 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dialisado contra PBS 1X, durante 72 horas a 4°C e, em seguida, esterilizado por filtração em membrana com porosidade de 0,22 µm (Filter millex HA, E.U.A.). O conteúdo protéico presente na preparação do antígeno solúvel de *Leishmania* foi determinado pelo método descrito por Lowry et al. (1951). A preparação antigênica foi conservada a -70°C em alíquotas (concentração de 325 µg/mL) para uso posterior nos ensaios de avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico após estimulação *in vitro* com antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*.

### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE SISTÊMICA E LOCALIZADA

Para alcançar os objetivos propostos, o presente estudo realizou a “**Caracterização da resposta imune no sangue periférico e no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea**”. A Figura 7 representa, de forma esquemática, as estratégias experimentais utilizadas.



**Figura 7:** Desenho esquemático, ilustrando as estratégias experimentais utilizadas para caracterização da resposta imune no sangue periférico e no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. \*A avaliação da produção de óxido nítrico intracelular foi realizada após estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania* (LSA).

#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO SANGUE PERIFÉRICO DA POPULAÇÃO AVALIADA

##### 4.7.1 Ensaios de fagocitose de formas promastigotas vivas de *Leishmania* (V.) braziliensis

Na execução dos ensaios da avaliação imunológica no sangue periférico foram utilizadas duas abordagens metodológicas, sendo uma destinada à avaliação do perfil imunofenotípico de monócitos pela análise de marcadores de superfície e outra ao perfil funcional de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> pela análise de citocinas intracitoplasmáticas. Inicialmente, foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos contendo anticoagulante EDTA (4 mL) e heparina sódica (30 mL) (Vacutainer, Becton Dickinson - BD, E.U.A.). Em seguida, o hemograma foi realizado e a partir do valor da global de leucócitos de cada indivíduo avaliado, calculou-se os ajustes necessários para obtenção de uma preparação celular com 1 x 10<sup>7</sup> leucócitos/mL.

Posteriormente, o sangue periférico coletado em heparina sódica foi transferido para um tubo cônico de polipropileno de 50 mL (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.) e centrifugado a 664 x g a temperatura de 18°C por 10 minutos. Após centrifugação, o plasma obtido foi retirado e armazenado a temperatura de -70°C. Em seguida, adicionou-se PBS 1X suplementado com 10% de SFB (mesmo volume de plasma retirado), a suspensão celular foi

homogeneizada e lavada por centrifugação a 664 x g a temperatura de 18°C por 10 minutos (esse procedimento foi repetido por mais uma vez). Por fim, foi realizado o ajuste da concentração celular para  $1 \times 10^7$  leucócitos/mL.

Após ajuste, leucócitos do sangue periférico foram incubados com parasitos vivos em tubos de cultura de polipropileno de 14 mL (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.) por uma hora sob agitação constante em homogeneizador hematológico (Hemoquímica Mod. H1, Brasil) em estufa a 37°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Além disso, foram realizadas também culturas nas mesmas condições descritas acima, entretanto, na ausência de parasitos, que foram utilizadas como culturas-controle. Após esse período de incubação, foram adicionados 20 µL de Brefeldina A - BFA (Sigma, E.U.A.) em todos os tubos (concentração final de 10 µg/mL), que foram mantidos por mais quatro horas em estufa nas condições mencionadas anteriormente. Posteriormente, foram adicionados 220 µL de EDTA (Sigma, E.U.A.) (concentração final de 2 mM), e as amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. É importante mencionar que foram realizadas culturas em duplicata para avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular e citocinas intracelulares.

#### *4.7.2 Avaliação do perfil imunofenotípico em monócitos do sangue periférico da população avaliada*

Amostras de 200 µL das culturas obtidas nos ensaios de fagocitose foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.), contendo 2 µL de anticorpos monoclonais para identificação da população de monócitos (anti-CD14-PerCP) e receptores *Toll* (TLRs) (anti-TLR-2-PE, anti-TLR-4-PE), receptores Fcγ (anti-CD32-PE, anti-CD64-PE), receptor do complemento (anti-CD35-PE), moléculas de ativação (anti-MHC-1-PE, anti-HLA-DR-PE, anti-CD23-PE) e moléculas de co-estimulação (anti-CD80-PE, anti-CD86-PE) (Tabela 2). Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando-se 3 mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution - FLS, Becton Dickson - BD, E.U.A), diluída dez vezes em água destilada, e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram centrifugadas a 357 x g a temperatura de 18°C por 7 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram desprezados, as suspensões celulares ressuspendidas em vortéx e foram adicionados 3 mL de PBS 1X, contendo 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica (Sigma, E.U.A.) - PBS-W.

As células foram lavadas por centrifugação a 357 x g a temperatura de 18°C por 7 minutos. Posteriormente, os tubos foram vertidos, as suspensões celulares ressuspendidas em vortéx e foram adicionados 150 µL de solução fixadora - MFF (10 g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) em cada tubo. Após um período de 15 minutos a 4°C, um total de 3.000 monócitos foram adquiridos e a análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos foi determinada com o auxílio do citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickson - BD, E.U.A.).

**Tabela 2:** Anticorpos utilizados para avaliação do perfil imunofenotípico de monócitos e linfócitos T

MARCADOR	FLUOROCROMO	CLONE	CONCENTRAÇÃO	FUNÇÕES/EXPRESSÃO
Anti-CD14	PerCP	9	0,5 µg	Receptor para complexo de lipopolissacarídeo e proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP) expresso em células mielomonocíticas.
Anti-CD4	PerCP	SK3	0,5 µg	Co-receptor para MHC de classe II. Expresso em subgrupos de timócitos, linfócitos T, monócitos e macrófagos.
Anti-CD8	PerCP	SK1	0,5 µg	Co-receptor para MHC de classe I. Expresso em subgrupos de timócitos e linfócitos T citotóxicos.
Anti-TLR-2	PE	TL2.1	0,5 µg	Receptor envolvido no reconhecimento de patógenos e ativação da resposta imune inata. Expresso em monócitos e neutrófilos.
Anti-TLR-4	PE	HTA125	0,5 µg	Receptor envolvido no reconhecimento de patógenos e ativação da resposta imune inata. Expresso em monócitos e mastócitos.
Anti-CD16	PE	3G8	0,5 µg	Componente de baixa afinidade do receptor Fc (Fcγ RIII). Mede a fagocitose e a ADCC.
Anti-CD32	PE	FLI8.26	0,5 µg	Receptor Fc de baixa afinidade para imunoglobulinas agregadas: complexos imunes.
Anti-CD64	PE	10.1	0,5 µg	Receptor de alta afinidade para IgG. Mede a fagocitose, a captura do antígeno e a ADCC.
Anti-CD35	PE	E11	0,5 µg	Receptor 1 de complemento, liga C3b e C4b, mediador de fagocitose.
Anti-MHC-I	PE	G46-2.6	0,5 µg	Molécula de MHC de classe I, expressa em células nucleadas humanas.
Anti-HLA-DR	PE	TÜ36	0,5 µg	Molécula de MHC de classe II expressa na superfície de células humanas.
Anti-CD23	PE	M-L233	0,5 µg	Molécula de ativação celular, receptor de baixa afinidade de IgE (FcεRII). Expresso em células B maduras, macrófagos ativados, eosinófilos, plaquetas.
Anti-CD80	PE	L307.4	0,5 µg	Co-regulação de ativação de linfócitos T. Expresso em céls. apresentadoras de antígeno.
Anti-CD86	PE	BAF141	0,5 µg	Co-regulação de ativação de linfócitos T. Expresso em céls. apresentadoras de antígeno.

**Fonte:** CD Reference Chart. 9th HLDA International Conference 2010, Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença 2007.

Abreviações: ADCC - Citotoxicidade celular dependente de anticorpo.

#### 4.7.3 Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico

Amostras de 500 µL das culturas obtidas nos ensaios de fagocitose foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.) contendo anticorpos monoclonais para identificação da população de monócitos (identificada por anti-CD14-PerCP) e subpopulações de linfócitos T (identificadas por anti-CD4-PerCP e anti-CD8-PerCP) (Tabela 2). Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando-se 3 mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution - FLS, Becton Dickson - BD, E.U.A), diluída dez vezes em água destilada, e incubadas por 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram centrifugadas a 357 x g a temperatura de 18°C por 7 minutos e posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão celular ressuspensa em vortéx. Em seguida, foram adicionados 500 µL de PBS-W, as amostras foram homogeneizadas em vortéx e posteriormente foram acrescentados 3 mL de PBS-W contendo 0,5% de saponina (Sigma, E.U.A.) - PBS-P. Os tubos foram fechados, homogeneizados por inversão e incubados por 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, as suspensões celulares foram lavadas por centrifugação a 357 x g a temperatura de 18°C por 7 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, as suspensões celulares ressuspensas em vortéx e foram adicionados 3 mL de PBS-W. Em seguida, as células foram lavadas por centrifugação a 357 x g, a temperatura de 18°C por 7 minutos. Posteriormente, os sobrenadantes foram desprezados e as células ressuspensas em 250 µL de PBS-W. Aliquotas de 30 µL das amostras foram transferidas para placas de fundo em U de 96 poços (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.), contendo 20 µL de anticorpos monoclonais anti-citocinas (IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17 - Tabela 3), previamente diluídos em PBS-P, e, em seguida, incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, foram adicionados 100 µL de PBS-P/poço, homogeneizou-se levemente e a placa foi submetida à centrifugação a 357 x g, a temperatura de 18°C por 7 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, as células ressuspensas em vortéx e em seguida, foram adicionados 200 µL de PBS-W, homogeneizou-se levemente e as suspensões celulares foram lavadas por centrifugação a 357 x g, a temperatura de 18°C por 7 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, as células ressuspensas em vortéx e foram adicionados 200 µL de solução fixadora - MFF/poço. Em seguida, as suspensões celulares foram transferidas para microtubos de poliestireno de 500 µL (Falcon, Becton Dickinson -

BD, E.U.A.). Após um período de 15 minutos a 4°C, um total de 3.000 monócitos foram adquiridos e a análise dos parâmetros morfométricos, fenotípicos-funcionais foi determinada com o auxílio do citômetro de fluxo FACScan - BD.

**Tabela 3:** Anticorpos utilizados para avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas

MARCADOR	FLUOROCROMO	CLONE	CONCENTRAÇÃO	FUNÇÕES/FONTES
Anti-IL-10	PE	JES3-19F1	0,25 µg	Potente supressor das funções dos macrófagos. Produzida por células T, macrófagos.
Anti-IL-12	PE	C11.5	0,25 µg	Ativa células NK, induz a diferenciação de células T CD4 em células <i>Tipo 1</i> . Produzida por macrófagos e células dendríticas.
Anti-TNF-α	PE	MAB11	0,25 µg	Inflamação local, ativação endotelial. Produzido por macrófagos, células NK e células T.
Anti-TGF-β	PE	TB21	0,25 µg	Inibe crescimento celular, antiinflamatório, induz mudança para produção de IgA. Produzido por condrócitos, monócitos e células T.
Anti-IL-4	PE	8D4-8	0,25 µg	Ativação de células B, mudança para IgE, induz diferenciação em células <i>Tipo 2</i> . Produzida por células T e mastócitos.
Anti-IFN-γ	PE	4S.B3	0,25 µg	Ativação de macrófagos, aumento da expressão de moléculas MHC e dos componentes do processamento de antígenos, mudança de classe de Ig, supressão de <i>resposta Tipo 2</i> . Produzido por células T e células NK.
Anti-IL-17	PE	eBio64DEC17	0,25 µg	Induz a produção de citocinas pelas células epiteliais, endotélio e fibroblastos. Produzida por células CD4 de memória.

**Fonte:** Sigal 2004 (Part I and II), Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença 2007.

#### 4.7.4 Estratégias experimentais utilizadas para análise dos dados

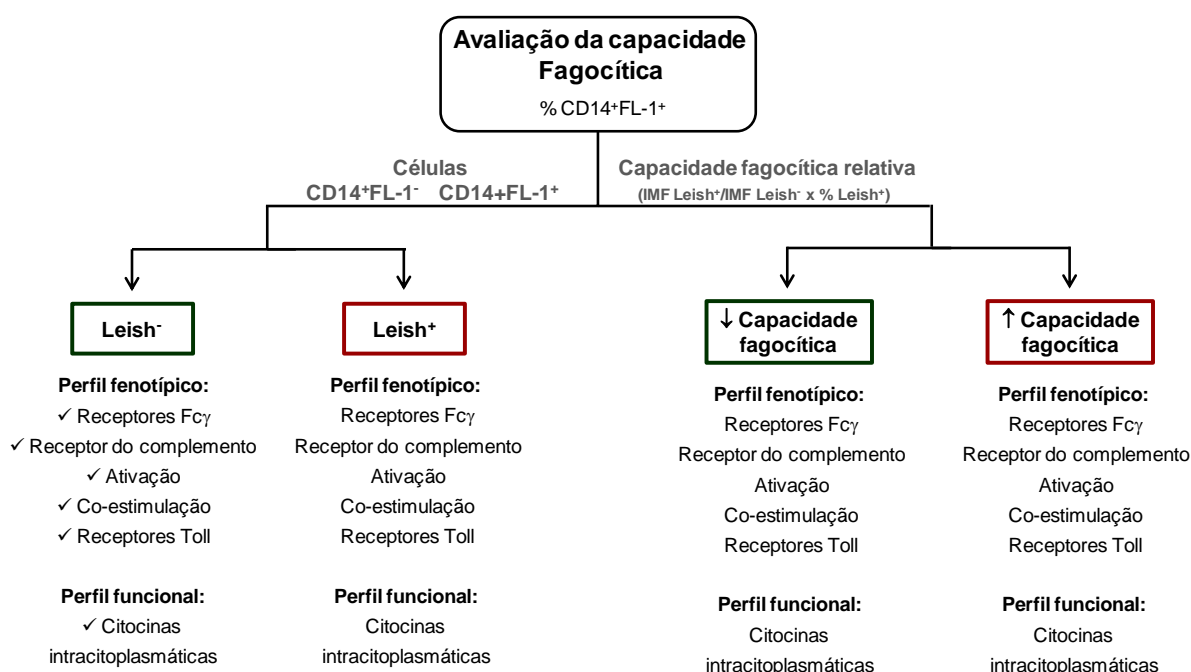
Para alcançar os objetivos propostos da avaliação imunológica do sangue periférico, três estratégias experimentais foram empregadas e estão ilustradas de forma esquemática na figura 8. Inicialmente avaliou-se a capacidade fagocítica da população de estudo através do



percentual de células monocíticas que fagocitaram promastigotas de *L. (V.) braziliensis* marcadas com FITC (monócitos CD14<sup>+</sup>Fluoresceína-FL-1<sup>+</sup>) conforme *item 4.7.5*.

A próxima estratégia correspondeu à avaliação do perfil fenotípico-funcional de monócitos que não fagocitaram (CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup>/Leish<sup>-</sup>) e aqueles que fagocitaram (CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup>/Leish<sup>+</sup>) promastigotas de *L. (V.) braziliensis* marcadas com FITC conforme *item 4.7.6*.

Por fim, os pacientes avaliados foram subcategorizados de acordo com a capacidade fagocítica, baseado no índice denominado “Capacidade fagocítica relativa” descrito no *item 4.7.7*. Posteriormente, avaliou-se o perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico, considerando a classificação proposta.



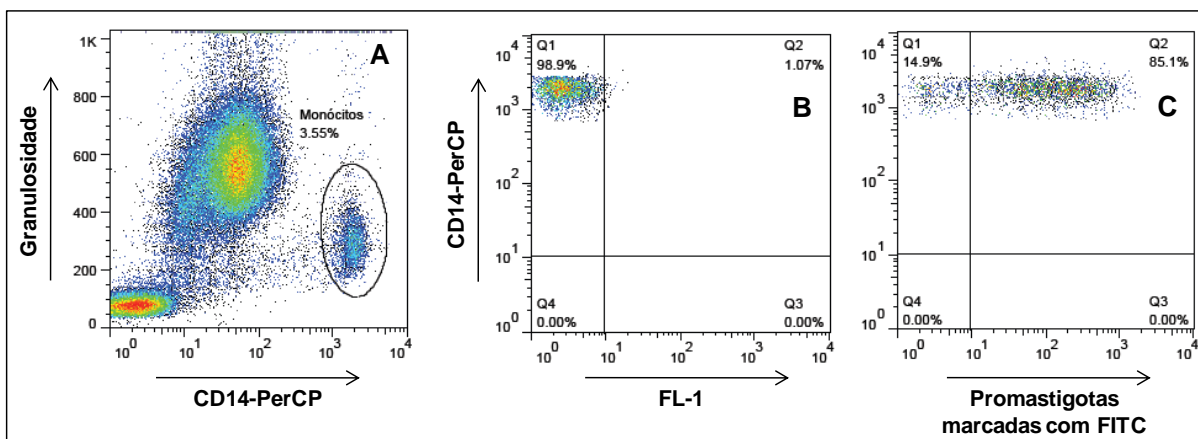
**Figura 8:** Desenho esquemático, ilustrando estratégias experimentais utilizadas para análise da capacidade fagocítica e perfil fenotípico-funcional da população avaliada, de acordo com as classificações propostas.

#### 4.7.5 Aquisição e análise ex vivo da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

Para identificação da população celular de interesse e determinação da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico utilizou-se o software FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 7.6.5.).

A Figura 9 representa, de forma esquemática, o método utilizado para análise dos resultados. A primeira estratégia (Figura 9A) consistiu na identificação da população de monócitos, que foi selecionada por uma janela - “gate”, através da construção de gráficos de

densidade de fluorescência-3 (FL-3, CD14-PerCP) versus granulosidade celular (Side Scatter - SSC). Após a seleção da população de interesse, as figuras 9B e 9C representam o perfil de monócitos na ausência e presença de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* marcadas com FITC, respectivamente. Dessa forma, a figura 9C ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), percentual de monócitos que fagocitaram leishmanias-FITC ( $CD14^+FL-1^+$ ), em gráfico de densidade de fluorescência-1 (FL-1, FITC) versus fluorescência-3 (FL-3, CD14-PerCP).



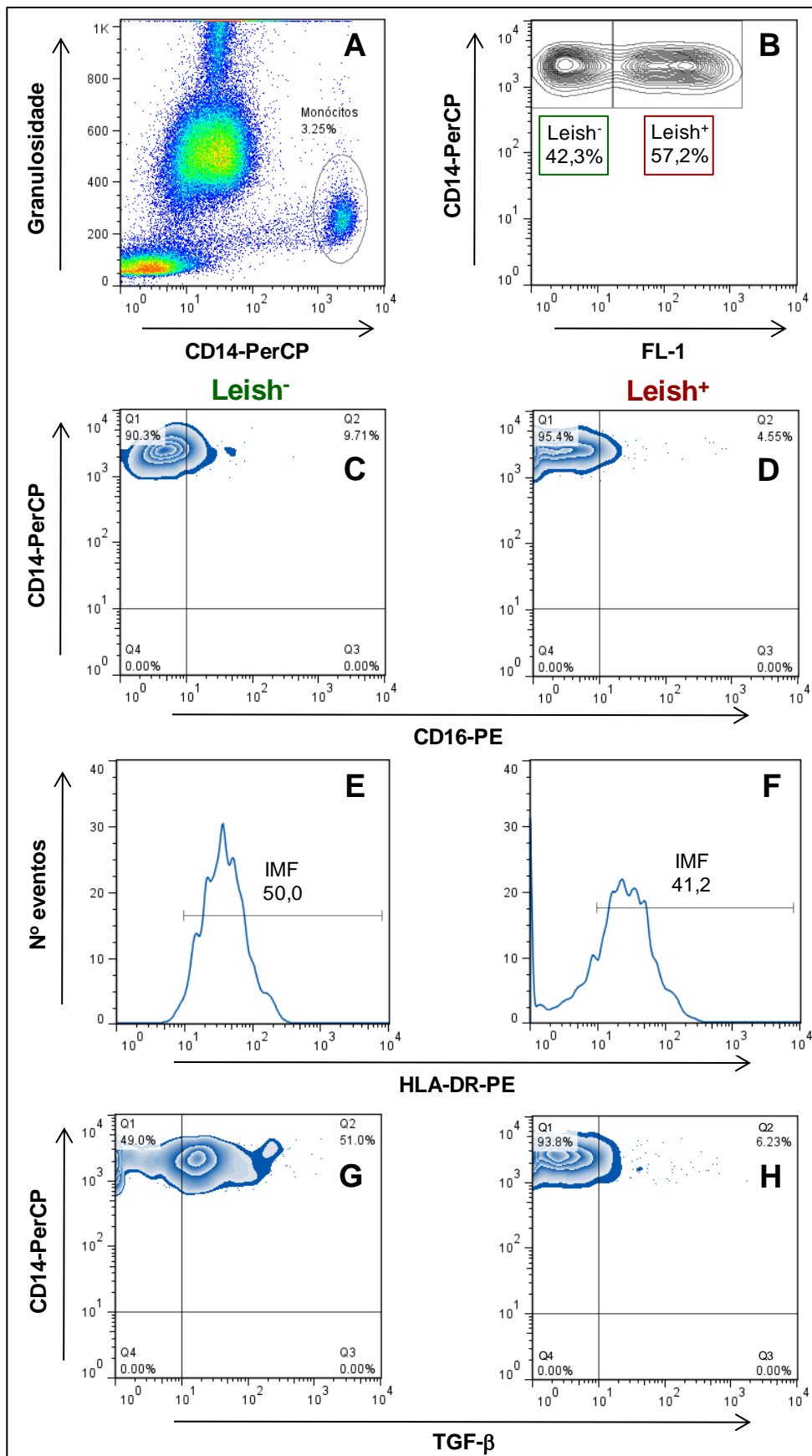
**Figura 9:** Análise representativa da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico da população avaliada (grupo com teste de Montenegro positivo sem lesão -  $TM^+sL$ ) por citometria de fluxo. A figura 9A representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) em função da granulosidade. A figura 9B representa o perfil de análise da população de monócitos na ausência de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em gráfico de densidade de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). A figura 9C representa o perfil de análise da população de monócitos na presença de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* marcadas com FITC, indicando no quadrante duplo positivo (Q2) o percentual de monócitos que fagocitaram o parasito-FITC em gráfico de densidade de fluorescência-1 (FITC) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP).

#### 4.7.6 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular e perfil de citocinas intracitoplasmáticas em células $CD14^+FL-1^-$ (*Leish^-*) e $CD14^+FL-1^+$ (*Leish^+*) do sangue periférico por citometria de fluxo

Para identificação da população celular de interesse e determinação do valor percentual/intensidade média de fluorescência (IMF) dos marcadores fenotípicos e do valor percentual de citocinas intracitoplasmáticas avaliados utilizou-se o software FlowJo.

A Figura 10 representa, de forma esquemática, o método utilizado para análise dos resultados. A primeira estratégia (Figura 10A) consistiu na identificação da população de monócitos (células  $CD14^+$ ), que foi selecionada por uma janela - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-3 (FL-3, CD14-PerCP) versus granulosidade celular (Side Scatter - SSC). A próxima estratégia (Figura 10B) consistiu na

identificação de células CD14<sup>+</sup> que não fagocitaram promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com FITC (CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup>) e células CD14<sup>+</sup> que fagocitaram leishmanias-FITC (CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup>) que foram selecionadas por janelas - “gate *Leish*<sup>-</sup> e *Leish*<sup>+</sup>”, respectivamente, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-1 (FL-1, FITC) versus fluorescência-3 (FL-3, CD14-PerCP) (Figura 10B). Dessa forma, as próximas estratégias consistiram na análise do fenótipo celular e perfil de citocinas intracitoplasmáticas em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> (*Leish*<sup>-</sup>) e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> (*Leish*<sup>+</sup>) do sangue periférico. As Figuras 10C e 10D ilustram, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção do receptor Fcγ CD16 na população de células *Leish*<sup>-</sup> e *Leish*<sup>+</sup>, respectivamente, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2, CD16-PE) versus fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP). As Figuras 10E e 10F representam a detecção da molécula de ativação HLA-DR na população de células *Leish*<sup>-</sup> e *Leish*<sup>+</sup>, respectivamente, em gráfico de histograma de fluorescência-2 (FL2, HLA-DR-PE) versus número de eventos. As Figuras 10G e 10H ilustram, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção intracitoplasmática da citocina TNF-α na população de células *Leish*<sup>-</sup> e *Leish*<sup>+</sup>, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2, TNF-α-PE) versus fluorescência-3 (FL3, CD4-PerCP).

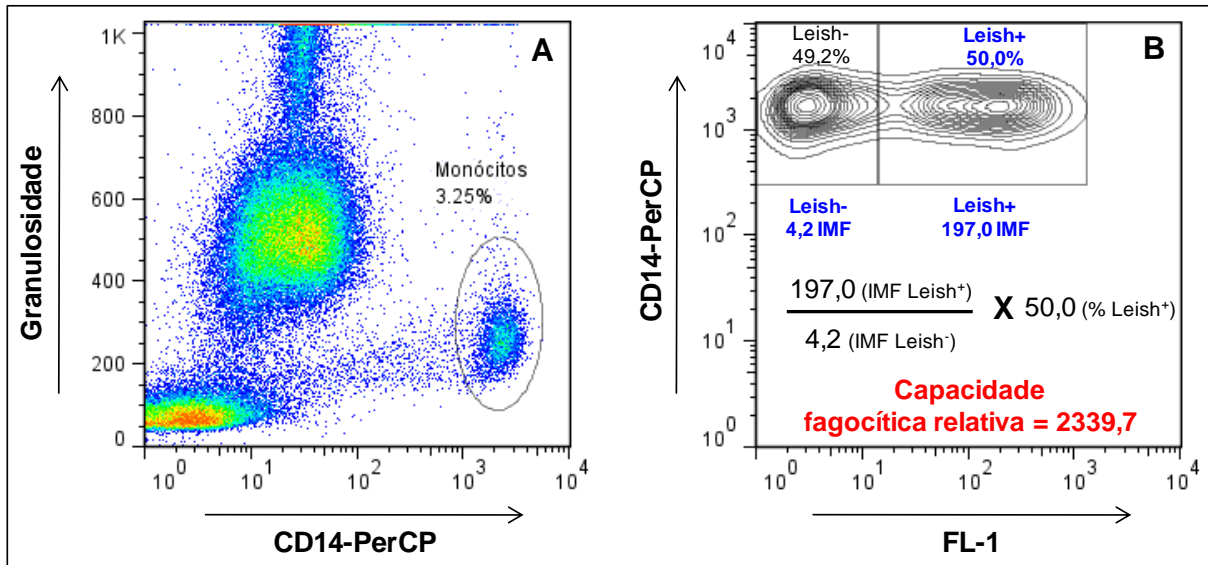


**Figura 10:** Análise de células  $CD14^+FL-1^-$  ( $Leish^-$ ) e  $CD14^+FL-1^+$  ( $Leish^+$ ) do sangue periférico da população avaliada (grupo com leishmaniose cutânea - LC) por citometria de fluxo. A figura **10A** representa o perfil celular da população de monócitos (células  $CD14^+$ ), selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) em função da granulosidade. **10B** representa o perfil de análise de células  $Leish^-$  e  $Leish^+$  em gráfico de contorno de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). **10C** e **10D** representam o perfil de análise de células  $Leish^-$  e  $Leish^+$ , respectivamente, positivas para CD16 no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (CD16-PE) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). **10E** e **10F** representam a análise da molécula HLA-DR por intensidade média de fluorescência (IMF) na população de células  $Leish^-$  e  $Leish^+$ , respectivamente, em gráfico de histograma de fluorescência-2 (HLA-DR-PE) versus número de eventos. **10G** e **10H** representam o perfil de análise de células  $Leish^-$  e  $Leish^+$ , respectivamente, positivas para citocina TGF- $\beta$  no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (TGF- $\beta$ -PE) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP).

4.7.7 *Avaliação do fenótipo celular e perfil de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico, considerando a capacidade fagocítica relativa*

Com o intuito de verificar se uma capacidade fagocítica diferenciada estaria associada a um perfil fenotípico-funcional distinto criou-se um índice denominado “*Capacidade fagocítica relativa*”. Para elaboração desse índice a primeira estratégia (Figura 11A) consistiu na identificação da população de monócitos, que foi selecionada por uma janela - “*gate*”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-3 (FL-3, CD14-PerCP) versus granulosidade celular (Side Scatter - SSC). Posteriormente, monócitos que não fagocitaram promastigotas de *L. (V.) braziliensis* marcadas com FITC (Leish<sup>-</sup>) e aqueles que fagocitaram leishmanias-FITC (Leish<sup>+</sup>) foram identificados/selecionados por janelas - “*gate Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup>*”, respectivamente, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-1 (FL-1, FITC) versus fluorescência-3 (FL-3, CD14-PerCP). Dessa forma, o índice “*Capacidade fagocítica relativa*” foi calculado, para cada indivíduo da população avaliada, através da razão entre valores de intensidade média de fluorescência de monócitos Leish<sup>+</sup>/Leish<sup>-</sup> multiplicado pelo percentual de monócitos Leish<sup>+</sup> (Figura 11B). Em seguida, os pacientes dos grupos CT, TM<sup>+</sup>sL e LC foram segregados, baseado na mediana dos valores do índice elaborado, em duas categorias: *Baixa* ou *Alta* capacidade fagocítica.

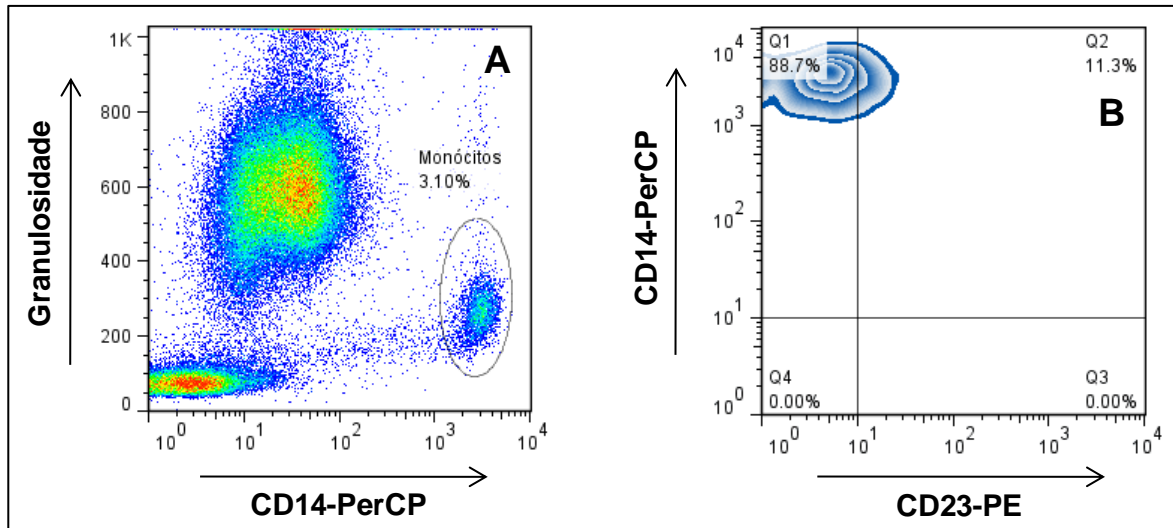
As próximas estratégias de análise referem-se à avaliação do perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, considerando a capacidade fagocítica relativa.



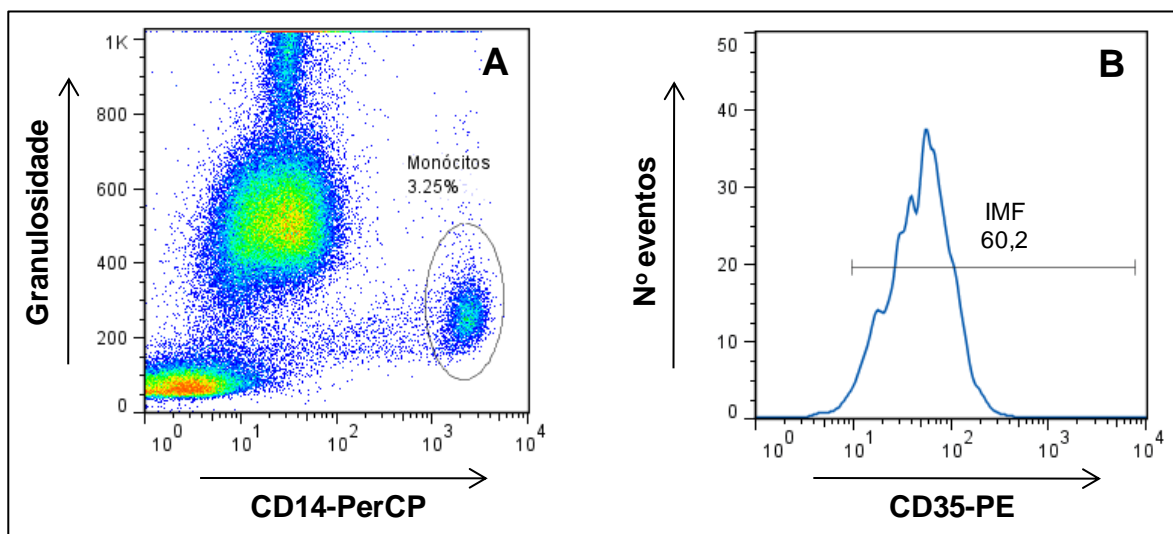
**Figura 11:** Estratégia para cálculo do índice “Capacidade fagocítica relativa”. A figura 11A representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) versus granulidade. 11B representa o perfil de análise de monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> em gráfico de contorno de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). A fórmula utilizada para cálculo do índice “Capacidade fagocítica relativa” está ilustrada dentro do gráfico.

#### 4.7.7.1 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

A identificação da população celular de interesse e a determinação do valor percentual/IMF dos marcadores fenotípicos avaliados foram realizadas pelo software FlowJo. As Figuras 12 e 13 representam, de forma esquemática, o método utilizado para a análise desses resultados. A primeira estratégia (Figuras 12A e 13A) consistiu na identificação da população de monócitos, que foi selecionada por uma janela - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP) versus granulidade celular (Side Scatter - SSC). A Figura 12B ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção da molécula de ativação CD23 na população de monócitos, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2, CD23-PE) versus fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP). A Figura 13B representa a detecção do receptor do complemento CD35 na população de monócitos, em gráfico de histograma de número de eventos versus fluorescência-2 (FL2, CD35-PE).



**Figura 12:** Análise do fenótipo celular de monócitos do sangue periférico da população avaliada (grupo com teste de Montenegro positivo sem lesão - TM<sup>s</sup>L) por citometria de fluxo. A figura 12A representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) versus granulidade. A figura 12B representa o perfil de análise da população de monócitos positivos para CD23 no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (CD23-PE) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP).



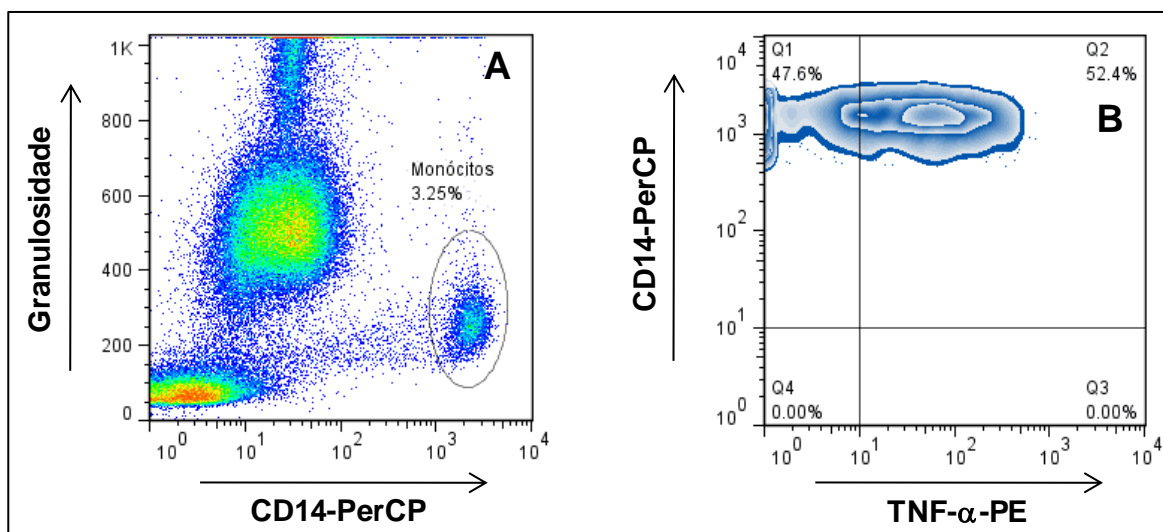
**Figura 13:** Análise do fenótipo celular de monócitos do sangue periférico da população avaliada (grupo com leishmaniose cutânea - LC) por citometria de fluxo. A figura 13A representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) versus granulidade. A figura 13B representa a detecção da molécula CD35 na população de monócitos, em gráfico de histograma de fluorescência-2 (CD35-PE) versus número de eventos.

4.7.7.2 Aquisição e análise pós-estimulação *in vitro* de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo

A identificação da população celular de interesse e a determinação do valor percentual de citocinas intracitoplasmáticas avaliadas foram realizadas pelo software FlowJo. As Figuras 14, 15 e 16 representam, de forma esquemática, o método utilizado para a análise desses

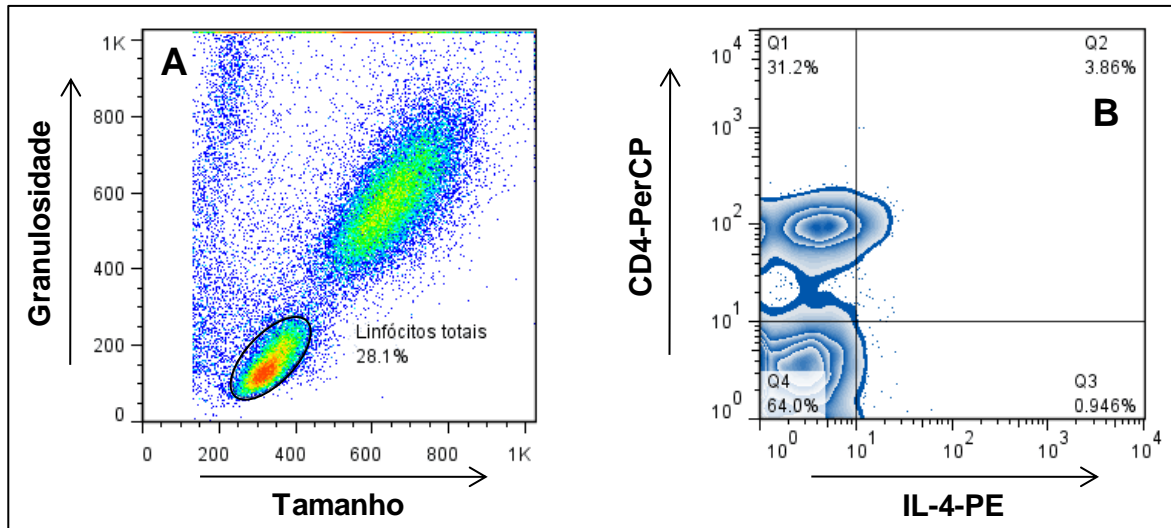
resultados. A primeira estratégia consistiu na identificação das populações de monócitos (Figura 14A) e linfócitos totais (Figuras 15A e 16A). A população de monócitos (Figura 14A) foi selecionada conforme descrito no *item 4.7.7.1* (Figuras 12A e 13A) da metodologia. A Figura 14B ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção intracitoplasmática da citocina TNF- $\alpha$  na população de monócitos, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2, TNF- $\alpha$ -PE) versus fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP).

A população de linfócitos totais foi selecionada por meio de gráficos de densidade de tamanho celular (Forward Scatter - FSC) versus granulosidade celular (Figuras 15A e 16A). A Figura 15B ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção intracitoplasmática da citocina IL-4 na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2, IL-4-PE) versus fluorescência-3 (FL3, CD4-PerCP). A Figura 16B ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção intracitoplasmática da citocina IL-10 na população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2, IL-10-PE) versus fluorescência-3 (FL3, CD8-PerCP).

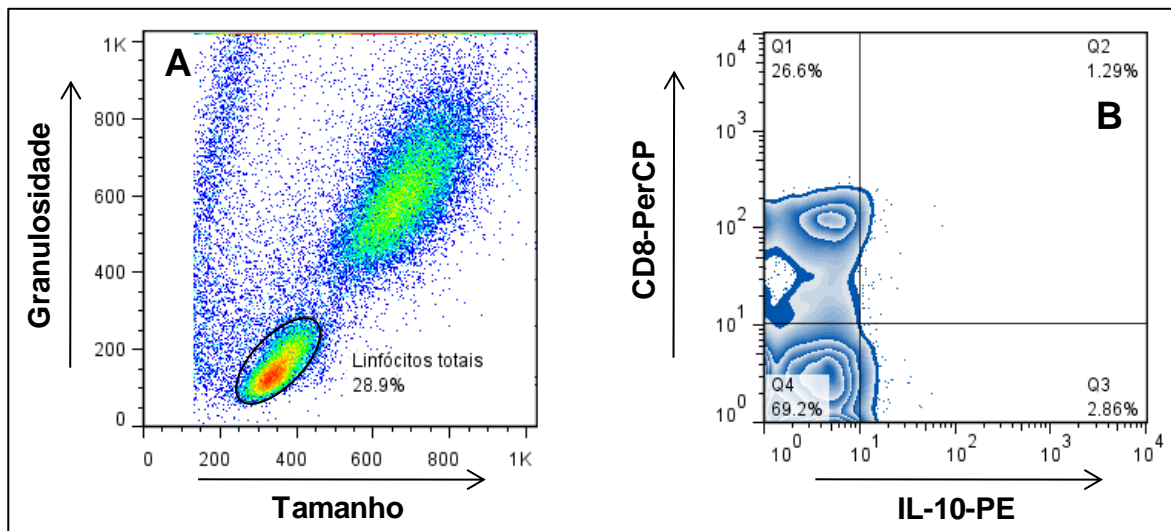


**Figura 14:** Análise de monócitos do sangue periférico da população avaliada (grupo com leishmaniose cutânea - LC) por citometria de fluxo. A figura 14A representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) versus granulosidade. A figura 14B representa o perfil de análise da população de monócitos positivos para citocina TNF- $\alpha$  no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (TNF- $\alpha$ -PE) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP).





**Figura 15:** Análise de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico da população avaliada (grupo controle - CT) por citometria de fluxo. A figura 15A representa o perfil celular da população de linfócitos totais, selecionada na janela “gate” linfócitos totais em gráfico de densidade de tamanho versus granulosidade. A figura 15B representa o perfil de análise da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> positivos para citocina IL-4 no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (IL-4-PE) versus fluorescência-3 (CD4-PerCP).



**Figura 16:** Análise de linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico da população avaliada (grupo controle - CT) por citometria de fluxo. A figura 16A representa o perfil celular da população de linfócitos totais, selecionada na janela “gate” linfócitos totais em gráfico de densidade de tamanho versus granulosidade. A figura 16B representa o perfil de análise da população de linfócitos TCD8<sup>+</sup> positivos para citocina IL-10 no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de densidade de fluorescência-2 (IL-10-PE) versus fluorescência-3 (CD8-PerCP).

#### 4.7.8 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico, após estimulação *in vitro* com antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*

Para avaliação dos níveis de NO intracelular utilizou-se metodologia que foi inicialmente descrita por Havenga et al. (2001) e Strijdom, Muller & Lochner (2004) e posteriormente adaptada e otimizada por nosso grupo (Schachnik et al. 2009). Essa estratégia

experimental consistiu na utilização do reagente diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA) que possui capacidade de penetrar no citoplasma celular, onde é convertido, por ação de esterases, a DAF-2. Esse composto, na presença de NO, sofre processo de oxidação, levando a formação do triazolofluoresceína (DAF-2T) que emite fluorescência na cor verde (FL-1), cuja intensidade é proporcional à concentração intracelular de NO e pode ser quantificada no citômetro de fluxo.

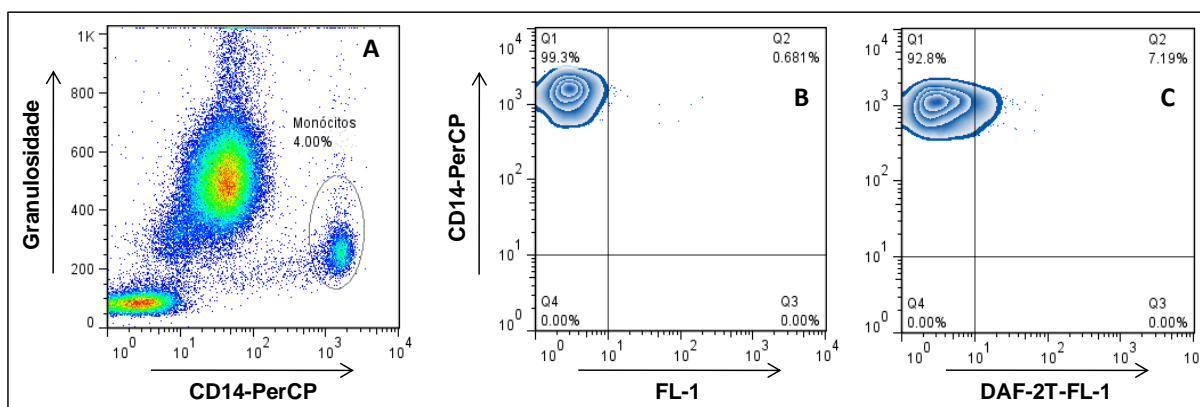
Dessa forma, inicialmente, ajustou-se a preparação celular para  $1 \times 10^7$  leucócitos/mL e após remoção do plasma, adicionou-se PBS 1X suplementado com 2% de albumina sérica bovina (BSA) (mesmo volume de plasma retirado). Após ajuste, realizou-se culturas de curta duração em tubos de polipropileno de 5 mL, por 4 horas em estufa 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, contendo as seguintes abordagens: controle da reação - amostras na presença de PBS; controle de produção basal - amostras na presença de DAF-2DA (concentração final de 2 µM); controle positivo - amostras na presença de DAF-2DA mais indutor da síntese de NO (LPS na concentração final de 10 µg/mL); controle de especificidade - amostras na presença de DAF-2DA mais inibidor da síntese de NO (aminoguanidina na concentração final de 10 mM); cultura estímulo-específico - amostras na presença de DAF-2DA mais antígeno solúvel de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (concentração final de 25 µg/mL).

Além disso, é importante mencionar que foi feito um tubo controle para cada estímulo, ou seja, um tubo na ausência do reagente DAF-2DA, com intuito de avaliar possíveis reações inespecíficas.

Após incubação, os tubos foram transferidos imediatamente para o gelo e adicionou-se 2 µL de anticorpo monoclonal para identificação da população de monócitos (anti-CD14-PerCP). As amostras foram novamente incubadas por 20 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando-se 2 mL de solução de lise comercial FLS, diluída dez vezes em água destilada, e incubadas por 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS 1X e as amostras foram centrifugadas a 357 x g a temperatura de 4°C por 7 minutos. Os tubos foram vertidos, as suspensões celulares ressuspendidas e novamente lavadas com 2 mL de PBS 1X. Posteriormente, os sobrenadantes foram desprezados, as suspensões celulares ressuspendidas em vortéx e adicionou-se 150 µL de solução fixadora - MFF em cada tubo. As amostras foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL e após período de 15 minutos a 4°C, um total de 3.000 monócitos foram adquiridos e a análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos foi determinada com o auxílio do citômetro de fluxo FACScan, Becton Dickson - BD, E.U.A.

#### 4.7.8.1 Aquisição e análise ex vivo dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

A identificação da população celular de interesse e a determinação do valor percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> foram realizadas pelo software FlowJo. A Figura 17 representa, de forma esquemática, o método utilizado para análise desses resultados. A primeira estratégia (Figura 17A) consistiu na identificação da população de monócitos, que foi selecionada por uma janela - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP) versus granulose celular (Side Scatter - SSC). Após seleção da população de interesse, a Figura 17B representa o perfil de monócitos na ausência do reagente DAF-2DA. Em seguida, a Figura 17C ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção de monócitos produtores de NO (DAF-2T<sup>+</sup>), em gráfico de densidade fluorescência-1 (FL1, DAF-2T) versus fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP).



**Figura 17:** Análise dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico da população avaliada (grupo com teste de Montenegro positivo sem lesão - TM<sup>+</sup>sL) por citometria de fluxo. A figura 17A representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de granulose versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). A figura 17B representa o perfil de análise da população de monócitos na ausência do reagente DAF-2DA em gráfico de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). A figura 17C representa o perfil de análise da população de monócitos produtores de NO (DAF-2T<sup>+</sup>) no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de densidade de fluorescência-1 (DAF-2T) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP).

#### 4.8 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DE LESÕES DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Os dados apresentados neste tópico compuseram a primeira publicação científica do estudo intitulada “**Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis**”, Costa-Silva et al., *Molecular Immunology*, 2013 e que está inserida no tópico “*Anexos*” da tese.

##### 4.8.1 População de estudo

Fragmentos de 5,0 mm de tecido provenientes das lesões de dezoito indígenas pertencentes ao grupo LC foram coletados e acondicionados adequadamente, de acordo com a metodologia a ser empregada. Inicialmente, parte desse fragmento foi armazenada em microtubo de 1,5 mL estéril contendo solução salina com antibióticos (estreptomicina 100µg/mL e penicilina 500U/mL) para diagnóstico parasitológico. E outra parte foi armazenada em microtubo RNase-free embebido em resina sintética para criopreservação (Tissue-Tek® OCT Compound, Sakura finetek, Torrance, CA, USA) e mantida em freezer a -70°C até o momento da extração do material genético.

Além disso, coletou-se também fragmentos de tecido saudável de cinco indígenas sem sinais sugestivos de leishmaniose cutânea e com TM negativo. Esses indivíduos haviam sido submetidos a pequenos procedimentos cirúrgicos no Hospital Municipal de São João das Missões, que também presta serviços de saúde à Comunidade indígena Xakriabá, e compuseram o grupo controle dessa parte do estudo.

A variação de idade entre os indivíduos do grupo controle foi de 15 a 72 anos ( $\bar{x}$  de idade  $44,6 \pm 22,4$  e mediana 39,0), sendo 02 mulheres e 03 homens. Entre os pacientes do grupo LC, essa variação foi de 8 a 73 anos ( $\bar{x}$  de idade  $27,8 \pm 16,0$  e mediana 25,5), sendo 06 mulheres e 12 homens (Tabela 5).

Posteriormente, os pacientes do grupo LC foram subdivididos de acordo com tempo de evolução da lesão: **lesão recente** aqueles com lesões  $\leq 3$  meses de evolução e **lesão tardia** aqueles com lesões  $> 3$  meses de evolução (Jara et al. 2013); número de lesões: **uma lesão** e **> uma lesão**; e tipo de lesão: **típica** e **atípica**, segundo critérios previamente descritos (Brasil MS 2006, 2007, Guimarães et al. 2009) (Tabela 5).

### 4.8.2 *Análise histopatológica*

Para estudos histopatológicos, amostras de dezesseis pacientes do grupo LC e quatro indígenas do grupo controle foram acondicionadas em formol tamponado (pH 7,2) a 10%, incluídas em parafina e posteriormente processadas (de Magalhães et al. 1986a, Bittencourt & Barral 1991). É importante mencionar que para realização da análise histopatológica, utilizou-se uma parte do fragmento do tecido que estava armazenado em *Tissue Tek*. Em seguida, os cortes histológicos foram corados por hematoxilina e eosina (H&E) e examinados no microscópio Zeiss AXIO OBSERVER.A1 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

Os principais parâmetros avaliados foram: identificação dos tipos celulares, características e classificação do infiltrado inflamatório, conforme descrito por de Magalhães et al. (1986a). As imagens exibidas em aumento de 20x e 63x foram digitalizadas pela câmera acoplada ao microscópio AxioCam MRc (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), utilizando o software AxioVision LE (version 4.8.2.0, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland). Essa parte do estudo foi coordenada pelo médico anátomo-patologista e infectologista Dr. Marcelo Antônio Pascoal da Universidade Federal de Minas Gerais.

### 4.8.3 *Avaliação da expressão gênica relativa por RT-qPCR*

Essa parte do estudo foi coordenada pelas biólogas moleculares Dr<sup>as</sup>. Luciana Inácia Gomes e Danielle Gomes Zauli do Centro de Pesquisa René Rachou.

#### 4.8.3.1 *Extração simultânea de RNA e DNA total de tecidos provenientes de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea*

Com o intuito de obter RNA e DNA total suficiente para avaliação dos genes de interesse e quantificação da carga parasitária, respectivamente, o tecido armazenado em resina sintética para criopreservação (Tissue-Tek<sup>®</sup>) a -70°C foi cortado utilizando criostato (em condições RNase-free) do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Após testes iniciais, verificou-se que 50 fragmentos de 4 µm proporcionaria material genético suficiente para alcançar os objetivos propostos.

Posteriormente, realizou-se a extração do material genético utilizando o RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) que permite obtenção de RNA de alta qualidade mesmo em

quantidades mínimas de amostra ( $\leq 5$  mg). Além disso, o protocolo sugerido pelo kit foi modificado segundo Martins (2009), possibilitando recuperação concomitante de DNA, utilizado nos estudos de quantificação da carga parasitária. As concentrações de RNA e DNA total foram determinadas utilizando o Qubit® Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) utilizando os kits: Quant-iT™ RNA Assay Kit e Quant-iT ds DNA HS Assay Kit, respectivamente (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Com o intuito de verificar a qualidade do material genético extraído, amostras de tecido provenientes de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea da comunidade indígena Xakriabá, porém que não faziam parte do biorrepositório do estudo, foram extraídas sob as mesmas condições mencionadas acima e submetidas à eletroforese em gel de agarose sob condições desnaturantes. A análise de integridade mostrou que as amostras avaliadas apresentavam bandas íntegras referentes as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal; e bandas íntegras e únicas referentes ao DNA extraído.

Além disso, paralelo à determinação da concentração do material genético pelo Qubit® Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) utilizou-se também o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) para determinar o grau de pureza das amostras em relação à presença de proteínas (leitura em absorvância a 260 e 280 nm). Posteriormente, verificou-se que todas amostras do presente estudo apresentaram grau de pureza satisfatório com razão absorvância 260/280 nm acima de 1,8.

#### 4.8.3.2 Síntese de ácido desoxirribonucleico complementar - cDNA

A transcrição reversa para síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit Omniscript Reverse Transcription (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acordo com recomendações sugeridas pelo fabricante. De forma sintética, utilizou-se 50 ng de RNA total previamente extraído, 2  $\mu$ L de tampão RT 10 vezes concentrado (concentração final 1x), 2  $\mu$ L de mix dNTP 5 mM (concentração final 0,5 mM), 2  $\mu$ L de Random primer (concentração final 10  $\mu$ M) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0,25  $\mu$ L de inibidor de ribonuclease (RNasin) 40 U/ $\mu$ L (concentração final 10 U/20  $\mu$ L) (Promega, Madison, WI, USA), 1  $\mu$ L de Omniscript Reverse Transcriptase 4 U (concentração final 4 U/20  $\mu$ L) e água RNase-free para um volume final de 20  $\mu$ L. Em seguida as amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C e posteriormente, armazenadas a temperatura de -20°C até o momento da amplificação por PCR em tempo real.

#### 4.8.3.3 Seleção de iniciadores

Os iniciadores para os genes avaliados (*IL10*, *TGF $\beta$ 1*, *IL4*, *IL12B*, *IFNG*, *TNF*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL5*, *CXCL10*) no presente estudo foram selecionados através de levantamento bibliográfico ou desenho manual (Primer3web versão 4.0.0), de acordo com os seguintes critérios de validação:

1. Conteúdo de C+G entre 50-60%;
2. Tamanho de 18-22 bases;
3. Temperatura de fusão ( $T_m$ ) entre 58-60°C;
4. Evitou-se utilizar iniciadores com mais de quatro bases em sequência de C e/ou G, e com mais do que 2 C ou G nas cinco últimas bases da extremidade 3';
5. Variação do tamanho dos *amplicons* de 80 a 200 pares de bases (pb);
6. Sequências que estavam entre junções de exons e introns.

As concentrações senso e anti-senso dos iniciadores selecionados foram estabelecidas através da construção de matrizes de iniciadores (concentração que proporcionou menor  $C_t$  e maior  $\Delta R_n$ ), em reações de RT-qPCR com cDNA proveniente de amostras do grupo controle. Além disso, utilizou-se o reagente Power Syber Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e condições de ciclagem universal: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C ou 62°C (*IL12B* and *TNF*) por 1 minuto no aparelho StepOne Plus (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para cada reação com os iniciadores e ao final de 40 ciclos realizou-se análise da curva de dissociação para verificar ocorrência de possíveis amplificações inespecíficas. Essa análise foi realizada pelo software StepOne versão 2.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

As concentrações estabelecidas, volume de cDNA, bem como temperatura de fusão ( $T_m$ ) para cada iniciador dos genes avaliados no presente estudo estão descritos na tabela 4. Além disso, a tabela 4 descreve também sequência de nucleotídeos, número de acesso ao GenBank (NCBI) e tamanho dos *amplicons*.

**Tabela 4:** Iniciadores utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR e suas características

GENES	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDEOS (5'- 3')	ACESSO GENBANK	TAMANHO AMPLICON	CONCENTRAÇÃO INICIADORES	VOLUME cDNA	TEMPERATURA ANELAMENTO	EFICIÊNCIA REAÇÃO	R <sup>2</sup>	REFERÊNCIA
ACTB	FW: ACCTCATGAAGATCCTCACC RV: CCATCTCTTGCTCGAAGTCC	AY582799.1	120bp	FW: 0.6µM RV: 0.6µM	1.0µL	60.0 °C	98.1%	0.989	(Musso et al. 1996)
IL10	FW: GTGATGCCCAAGCTGAGA RV: CACGGCCTTGCTCTTGTTTT	U16720.1	138bp	FW: 2.0µM RV: 2.0µM	1.0µL	60.0 °C	96.1%	0.998	(Overbergh et al. 2003)
TGFB1	FW: CAGCAACAATTCCTGGCGATA RV: AAGGCGAAAGCCCTCAATTT	NM_000660.4	136bp	FW: 2.0µM RV: 2.0µM	1.0µL	60.0 °C	96.8%	0.999	(Overbergh et al. 2003)
IL4	FW: CACAGGCACAAGCAGCTGAT RV: CTCTGGTTGGCTTCCTCACA	M23442.1	101bp	FW: 0.9µM RV: 0.9µM	2.0µL	60.0 °C	97.5%	1.000	(Chong et al. 2008)
TNF	FW: TCTTCTCGAACCCCGAGTGA RV: CCTCTGATGGCACCACCAG	X02910.1	151bp	FW: 1.0µM RV: 1.0µM	1.0µL	62.0 °C	98.2%	0.985	(Overbergh et al. 2003)
IFNG	FW: TTCAGCTCTGCATCGTTTTG RV: TCCGCTACATCTGAATGACCT	NM_000619 NG_015840.1	112bp	FW: 1.0µM RV: 1.0µM	1.0µL	60.0 °C	97.5%	0.976	(Dhanasekaran et al. 2010)
IL12B	FW: TGGAGTGCCAGGAGGACAGT RV: TCTTGGGTGGGTCAGGTTTG	NM_002187.2 NG_009618.1	147bp	FW: 1.0µM RV: 1.5µM	1.0µL	62.0 °C	96.2%	0.995	(Overbergh et al. 2003)
CCL2	FW: AGTCTCTGCCGCCCTTCT RV: GTGACTGGGGCATTGATTG	M37719.1	93bp	FW: 1.0µM RV: 1.0µM	1.0µL	60.0 °C	99.3%	0.997	(Lin & Chuang 2010)
CCL3	FW: GCAACCAGTTCTCTGCATCA RV: TGGCTGCTCGTCTCAAAGTA	D90144.1	140bp	FW: 1.0µM RV: 1.0µM	1.0µL	60.0 °C	98.1%	0.990	(Zhang et al. 2010)
CCL5	FW: CAGCCCTCGCTGTCATCCTCA RV: TTGGCGGTTCTTTCGGGTGAC	DQ017060.1	197bp	FW: 0.1µM RV: 0.1µM	1.0µL	60.0 °C	99.1%	0.984	Desenho manual
CXCL10	FW:GCCAATTTTGTCCACGTGTTG RV: AGCCTCTGTGTGGTCCATCCT	NM_001565.3	193bp	FW: 1.0µM RV: 1.0µM	1.0µL	60.0 °C	93.0%	0.999	(Toki et al. 2009)

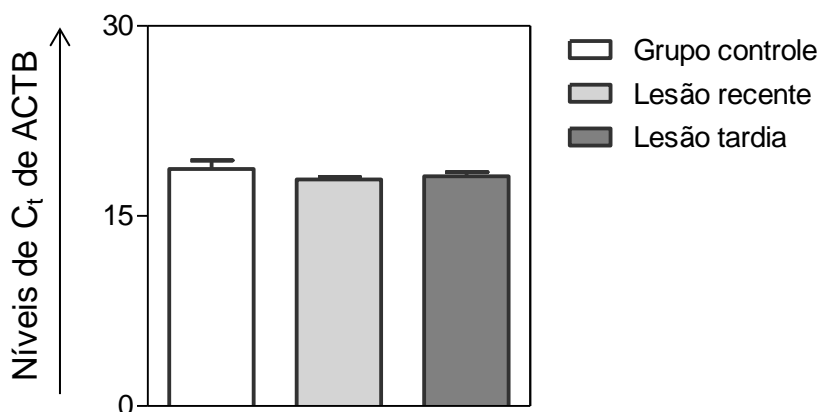
Abreviações: FW - Forward primer; RV - Reverse primer.



#### 4.8.3.4 Avaliação da uniformidade dos níveis de expressão do controle endógeno

A etapa de validação da estabilidade do gene constitutivo é fundamental em reações de PCR em tempo real, pois garante mais precisão e confiabilidade na quantificação do alvo de interesse. No presente estudo, o gene constitutivo *ACTB* foi previamente selecionado como controle endógeno. Para verificar a uniformidade de expressão desse gene foi realizada uma reação de RT-qPCR com amostras de cDNA provenientes de cada grupo do estudo: controle (04 amostras), lesão recente (04 amostras) e tardia (04 amostras). As condições de reação e ciclagem foram estabelecidas na etapa de escolha dos iniciadores e otimização do ensaio, conforme item 4.8.3.3 da metodologia e Tabela 4.

Posteriormente, os dados gerados foram analisados por comparação da média dos níveis de *ciclo threshold* ( $C_t$ ) pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (Figura 18). A análise dos resultados mostrou que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os três grupos avaliados (**Grupo controle:**  $C_{tACTB} = 18.71 \pm 0.6730$ ; **Lesão recente:**  $C_{tACTB} = 17.88 \pm 0.2141$ ; **Lesão tardia:**  $C_{tACTB} = 18.14 \pm 0.3129$ ). Sendo assim, o gene *ACTB* foi escolhido como controle endógeno para as reações de RT-qPCR do presente estudo.



**Figura 18:** Avaliação da uniformidade dos níveis de expressão de *ACTB* da população avaliada por RT-qPCR. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão dos níveis de  $C_t$  em formato de gráficos de barras.

#### 4.8.3.5 Avaliação da eficiência de amplificação dos iniciadores

A avaliação da eficiência da reação de RT-qPCR para os iniciadores utilizados no presente estudo foi realizada através da construção de curvas-padrão com diluições seriadas de uma amostra de cDNA do grupo controle (1 ng/ $\mu$ L a 0,05 ng/ $\mu$ L), conforme ensaio

otimizado para cada gene alvo (Item 4.8.3.3 e Tabela 4). Posteriormente, os resultados foram plotados em gráficos onde o eixo X representava o Log da concentração de cDNA e o eixo Y, o valor de  $C_t$  para cada concentração. Os primers foram considerados adequados para avaliação da expressão gênica quando apresentavam eficiência acima de 95%, determinada pelo *slope* da curva aplicado na seguinte fórmula: Eficiência =  $[10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$ . Os valores de *baseline* e *threshold* foram ajustados para cada ensaio, utilizando-se o software StepOne version 2.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A eficiência da reação e o respectivo coeficiente de linearidade de cada iniciador analisado estão descritos na Tabela 4.

#### 4.8.3.6 Detecção dos níveis de expressão gênica de citocinas e quimiocinas por RT-qPCR

Os ensaios para análise da expressão gênica das amostras avaliadas no presente estudo foram realizados utilizando 1,0 ou 2,0 (IL4)  $\mu\text{L}$  de cDNA, 12,5  $\mu\text{L}$  de Power Syber Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e concentração específica para cada iniciador (Tabela 4), perfazendo volume final de 25  $\mu\text{L}$  de reação. Os ensaios foram realizados em duplicata com o gene *ACTB* presente na mesma placa que os demais genes avaliados. Além disso, dois controles internos foram incluídos a fim de verificar contaminação por DNA genômico, bem como pureza dos reagentes (*no template control* - NTC). Os valores de *baseline* e *threshold* foram ajustados para cada ensaio, utilizando o software StepOne version 2.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os resultados foram expressos pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ ACTB}) \text{ amostra teste} - (C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ ACTB}) \text{ amostra controle}}$  (Livak & Schmittgen 2001).

#### 4.8.3.7 Análise do perfil panorâmico de citocinas e quimiocinas moduladoras/inflamatórias

O padrão global de expressão gênica relativa de citocinas e quimiocinas moduladoras/inflamatórias foi analisado conforme metodologia descrita por nosso grupo (Luiza-Silva et al. 2011a). Essa estratégia experimental consistiu em:

1. Quantificação dos níveis de expressão gênica para cada citocina/quimiocina avaliada;
2. Cálculo do ponto de corte para segregar pacientes com baixa e alta expressão das citocinas/quimiocinas de interesse, empregando a mediana global de cada gene avaliado;
3. Posteriormente, os pacientes foram categorizados em baixos e altos “expressores”, de acordo com mediana previamente determinada;

4. Cálculo da frequência (%) de alto “expressores”, para cada gene avaliado, nos grupos **lesão recente e tardia**;

5. Determinação da assinatura de citocinas e quimiocinas desencadeada pelos grupos **lesão recente e tardia**.

As assinaturas foram comparadas pela sobreposição do perfil ascendente dos grupos. Diferenças significativas foram consideradas quando a frequência para determinada citocina ou quimiocina ultrapassou o percentil 50<sup>th</sup> (Campi-Azevedo et al. 2012).

Além disso, é importante mencionar que a análise dos dados por assinatura permite detecção de diferenças sutis, por vezes não detectadas pelos métodos estatísticos convencionais.

#### 4.8.3.8 Análise por Heat map e agrupamento hierárquico

A análise por *heat map* foi realizada com o intuito de verificar associação entre o perfil de expressão gênica do infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de LC, segundo: tempo de evolução (recente e tardia), número (uma e > uma lesão) e tipo (típica e atípica) de lesões. Essa representação foi desenhada em linguagem R (R Development Core Team 2011), utilizando bibliotecas *gplots* com os dados plotados convertidos para *score-Z*.

Para o agrupamento hierárquico dos pacientes avaliados utilizou-se bibliotecas *hclust*, conforme Langfelder & Horvath (2012). Essa parte do estudo foi coordenada pelo bioinformata Me. Tiago Antônio de Oliveira Mendes da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### 4.8.4 Quantificação da carga parasitária

##### 4.8.4.1 Fragmento alvo e iniciadores

O gene da pequena subunidade do RNA ribossomal (SSU rRNA), conservado em todas espécies de *Leishmania*, foi escolhido como alvo para quantificação da carga parasitária no infiltrado inflamatório da população avaliada (van Eys et al. 1992). Esse alvo apresenta 160 cópias no genoma do parasito, conferindo sensibilidade e estabilidade quantitativa para o ensaio.

Os iniciadores senso LEIS.U1 (5' - AAGTGCTTTCCCATCGCAACT - 3') e antisenso LEIS.L1 (5' - GACGCACTAAACCCCTCCAA - 3'), que geram um fragmento de

67pb do SSU rRNA, foram utilizados conjuntamente com uma sonda TaqMan, LEIS.P1 (FAM 5' - CGGTTCGGTGTGTGGCGCC - 3' TAMRA) (Wortmann et al. 2001).

#### 4.8.4.2 Construção da curva padrão

A curva padrão utilizada no ensaio molecular quantitativo para avaliação da carga parasitária foi elaborada a partir de plasmídeos, contendo o fragmento de interesse clonado. Sendo assim, os produtos de PCR do SSU rRNA foram clonados no vetor pCR-4 TOPO (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme instruções do fabricante.

Inicialmente, a linhagem TOP10 da bactéria *Escherichia coli* foi submetida a ensaios de competência, por meio de choque térmico, para torná-la apta ao vetor contendo o inserto. Em seguida, as colônias de bactérias foram avaliadas por PCR convencional, utilizando os iniciadores mencionados anteriormente, para verificar presença do fragmento de interesse. Após essa etapa, as bactérias foram cultivadas por 12 horas a 37°C em meio Luria-Bertani, suplementado com ampicilina. Os plasmídeos foram extraídos de acordo com protocolo de extração plasmidial (Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System - Promega, Madison, WI, USA) e, posteriormente, submetidos à reação de restrição enzimática para linearização. Em seguida foram purificados (Kit Healthcare Illustra Microspin G-25 - GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, USA) e dosados, e para construção da curva padrão do ensaio de RT-qPCR utilizou-se quantidades determinadas de cópias do fragmento do genoma de *Leishmania (V.) braziliensis* a ser amplificado.

#### 4.8.4.3 PCR quantitativa em tempo real

A RT-qPCR foi realizada para determinar a quantidade de DNA de *Leishmania* nas amostras teciduais avaliadas. O DNA previamente extraído foi submetido à amplificação e quantificação do número de cópias do fragmento de 67pb do SSU rRNA de *Leishmania (V.) braziliensis*.

Os ensaios foram realizados com os iniciadores descritos e o sistema de detecção TaqMan<sup>®</sup> (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA): iniciadores LEIS.U1 (concentração final 0,3 pmol/μL) e LEIS.L1 (concentração final 0,3 pmol/μL), TaqMan<sup>®</sup> Master Mix 1x e Sonda LEIS.P1 (concentração final 0,25 pmol/μL), perfazendo volume final de 20 μL de reação. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. Curvas padrões com seis pontos em triplicata (diluições seriadas em base decimal de 160.000.000 a 160) dos

plasmídeos pCR-4 TOPO (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) com o gene de interesse clonado foram utilizadas em cada experimento.

O programa de amplificação foi realizado nas seguintes condições: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento, e, por fim, extensão a 72°C por 5 minutos.

A quantidade de parasitos foi determinada por normalização com o número de cópias do gene constitutivo *ACTB*, utilizando um fator de correção (razão entre o n° de cópias de *ACTB* das amostras/maior valor do n° de cópias de *ACTB* obtido no experimento) (Overbergh et al. 1999, Gomes et al. 2012). Sendo assim, realizou-se ensaios de RT-qPCR para o gene humano *ACTB*, utilizando os iniciadores Aco1 e Aco2 (Musso et al. 1996), que geram um fragmento de 120pb, e o sistema de detecção Power Syber Green (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Curvas padrões obtidas e padronizadas (diluições seriadas em base decimal de  $2,44 \times 10^{10}$  a 24.437,08), como descrito anteriormente, foram analisadas em cada ensaio para determinação do número de cópias do gene *ACTB*.

Todos os ensaios foram realizados e analisados no aparelho StepOne Plus e software StepOne version 2.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), respectivamente.

#### 4.9 *Análise estatística dos dados*

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism (San Diego, E.UA., versão 5.00) para comparação entre os grupos. Para a análise comparativa entre dois grupos foi empregado o teste T de student para dados paramétricos e o teste de Mann Whitney para dados não paramétricos. Para a análise comparativa entre três grupos foi empregado o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns para dados não paramétricos. A associação entre citocinas produzidas no sangue periférico por monócitos e subpopulações de linfócitos T e aquelas expressas no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose foi investigada por análises de correlação, utilizando o teste de correlação de Spearman ( $r$ ). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o valor de  $p$  foi menor que 0,05.



### APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os dados gerados no presente estudo serão apresentados sob a forma de três tópicos. No primeiro tópico (TÓPICO I) serão apresentados resultados referentes à “*Caracterização da resposta imune sistêmica*” por meio da avaliação da capacidade de monócitos do sangue periférico em internalizar promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e caracterização do perfil fenotípico dessas células através da análise de receptores Fc $\gamma$ , receptor do complemento, receptores *Toll*, moléculas de ativação e co-estimulação, após interação com promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*. Além disso, serão apresentados resultados relacionados à caracterização de aspectos funcionais (produção de citocinas e óxido nítrico intracelulares) em monócitos e linfócitos T do sangue periférico, após a mesma estratégia de interação mencionada acima.

No segundo tópico (TÓPICO II) serão apresentados resultados referentes à “*Caracterização da resposta imune localizada*” através de avaliação histopatológica e análise da expressão gênica de citocinas e quimiocinas por RT-qPCR, bem como quantificação da carga parasitária no infiltrado inflamatório das lesões dos pacientes do grupo LC.

No terceiro tópico (TÓPICO III) será apresentada uma síntese com os resultados mais significativos do presente estudo.

**5.1 TÓPICO I:**

*“Avaliação da capacidade fagocítica e caracterização do perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de L. (V.) braziliensis”*

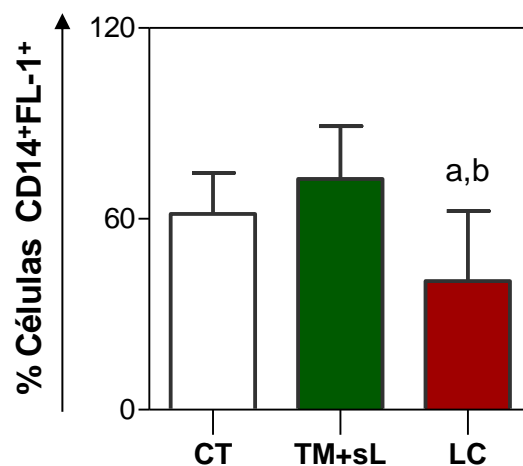


5.1.1 Avaliação da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*

Por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, envolvendo receptores do complemento (CR1, CR3 e C3b) e ligantes em ambas superfícies, o parasito adere-se à superfície de macrófagos, sendo internalizado por um processo denominado fagocitose (Awasthi, Mathur & Saha 2004).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de LC. Esse parâmetro foi analisado pelo percentual de células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> (Figura 19).

A avaliação da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico da população estudada demonstrou que pacientes do grupo LC apresentaram menor percentual de células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em relação aos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL - Figura 19.



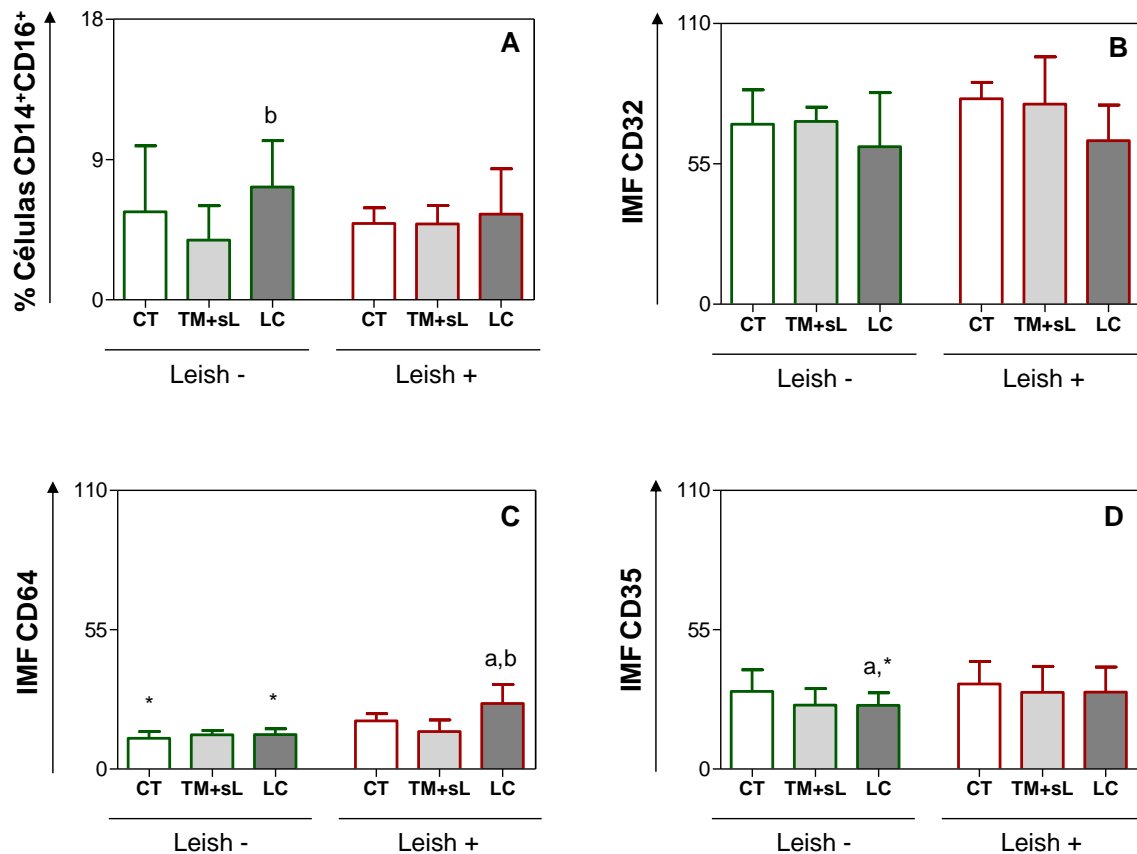
**Figura 19:** Avaliação da capacidade fagocítica de monócitos de indivíduos dos grupos Controle (□ = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (■ = 15) e Leishmaniose cutânea (■ = 23). Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do percentual de células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente.

5.1.1.1 Avaliação de receptores  $Fc\gamma$  (CD16, CD32 e CD64) e receptor do Complemento (CD35) em células  $CD14^+FL-1^-$  (Leish<sup>-</sup>) e  $CD14^+FL-1^+$  (Leish<sup>+</sup>) do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*

A análise de receptores  $Fc\gamma$  (CD16, CD32, CD64) e do complemento (CD35) em monócitos circulantes Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de pacientes portadores de LC foi realizada com o intuito de avaliar o impacto que a internalização de formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* teria na expressão desses marcadores. Os receptores CD32, CD64 e CD35 (Figuras 20B, 20C, 20D respectivamente) foram analisados pela intensidade média de fluorescência (IMF) e CD16 (Figura 20A) pelo valor percentual de monócitos positivos para esse marcador.

A análise do perfil de receptores  $Fc\gamma$  (CD16, CD32 e CD64) demonstrou que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo LC apresentaram maior percentual de CD16 quando comparado ao grupo  $TM^+sL$  (Figura 20A). A avaliação de CD64 mostrou que monócitos Leish<sup>+</sup> do grupo LC apresentaram maior IMF dessa molécula em relação aos grupos CT e  $TM^+sL$  (Figura 20C). Além disso, verificou-se que monócitos Leish<sup>-</sup> dos grupos CT e LC apresentaram menor IMF desse marcador em relação a monócitos Leish<sup>+</sup> dos mesmos grupos (Figura 20C). Por fim, a análise do receptor do complemento mostrou que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo LC apresentaram menor IMF de CD35 em relação ao grupo CT (Figura 20D). Além disso, observou-se que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo LC apresentaram menor IMF dessa molécula em relação a monócitos Leish<sup>+</sup> do mesmo grupo (Figura 20D).

Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise do receptor CD32 (Figura 20B).



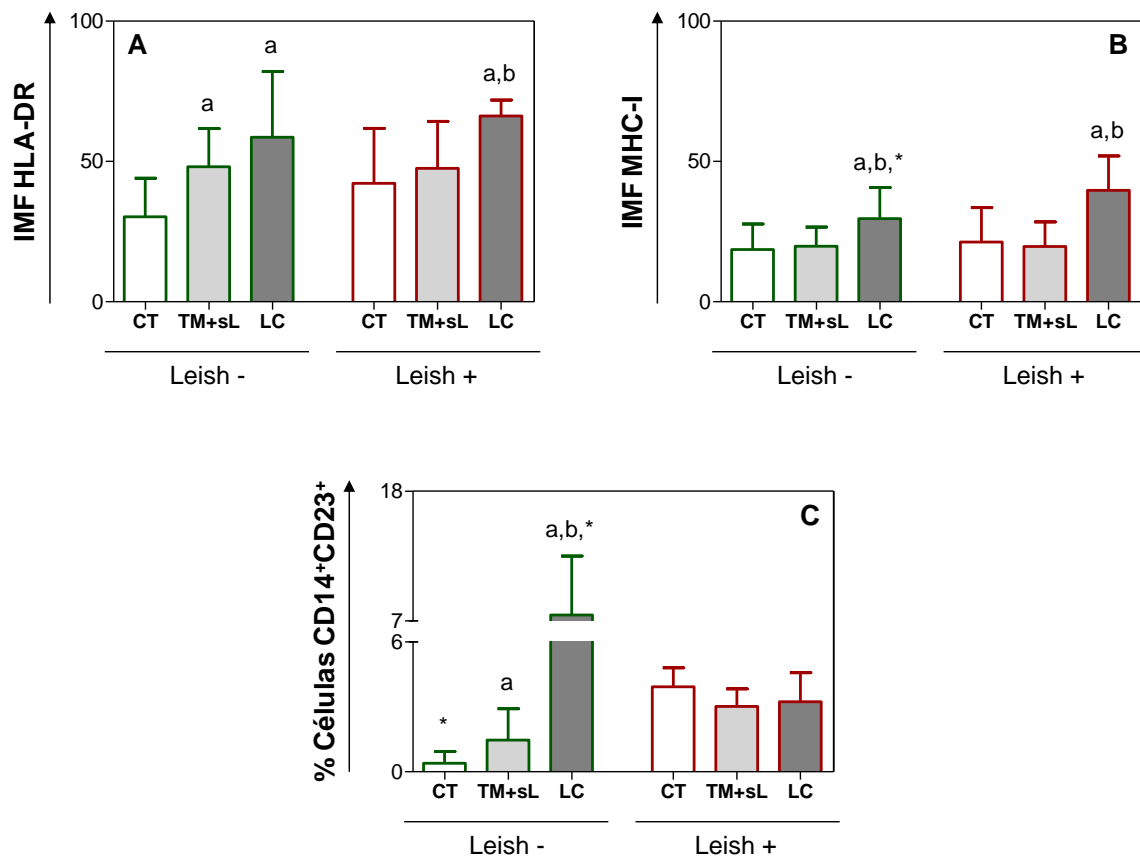
**Figura 20:** Avaliação do perfil de receptores Fcγ e do complemento em monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM+sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23). Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do percentual do receptor CD16 (A) e intensidade média de fluorescência (IMF) dos receptores CD32 (B), CD64 (C) e CD35 (D) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM+sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> estão representadas por asterisco (\*).

### 5.1.1.2 Avaliação de moléculas de ativação (HLA-DR, MHC-I e CD23) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> (Leish<sup>-</sup>) e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> (Leish<sup>+</sup>) do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*

Vários estudos já demonstraram o perfil de ativação de linfócitos T e subpopulações na LC (Martínez-Arends et al. 1991, Gaafar et al. 1999, Baratta-Masini et al. 2007, Freitas-Teixeira et al. 2012), entretanto raros são os trabalhos que investigaram esse perfil em monócitos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de moléculas de ativação em monócitos circulantes Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de pacientes portadores de LC e o impacto que a internalização de formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* teria na expressão desses marcadores. As moléculas de ativação HLA-DR e MHC-I foram

analisadas por IMF e CD23 pelo valor percentual de monócitos positivos para esse marcador (Figuras 21A, 21B, 21C respectivamente).

A análise dos dados mostrou que monócitos Leish<sup>-</sup> dos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram maior IMF de HLA-DR quando comparado ao grupo CT (Figura 21A). Além disso, observou-se que monócitos Leish<sup>+</sup> do grupo LC apresentaram maior IMF dessa molécula em relação aos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL (Figura 21A). Os resultados mostraram maior IMF de MHC-I em monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> do grupo LC em relação as mesmas populações celulares dos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL (Figura 21B). Além disso, verificou-se que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo LC apresentaram menor IMF dessa molécula quando comparado a monócitos Leish<sup>+</sup> do mesmo grupo (Figura 21B). Por fim, a avaliação de CD23 mostrou que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior percentual desse marcador em relação ao grupo CT (Figura 21C). Além disso, observou-se maior percentual dessa molécula em monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo LC em relação aos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL (Figura 21C). Os resultados mostraram também menor percentual de CD23 em monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo CT quando comparado a monócitos Leish<sup>+</sup> do mesmo grupo (Figura 21C). Por outro lado, observou-se maior percentual desse marcador em monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo LC em relação a monócitos Leish<sup>+</sup> do mesmo grupo (Figura 21C).



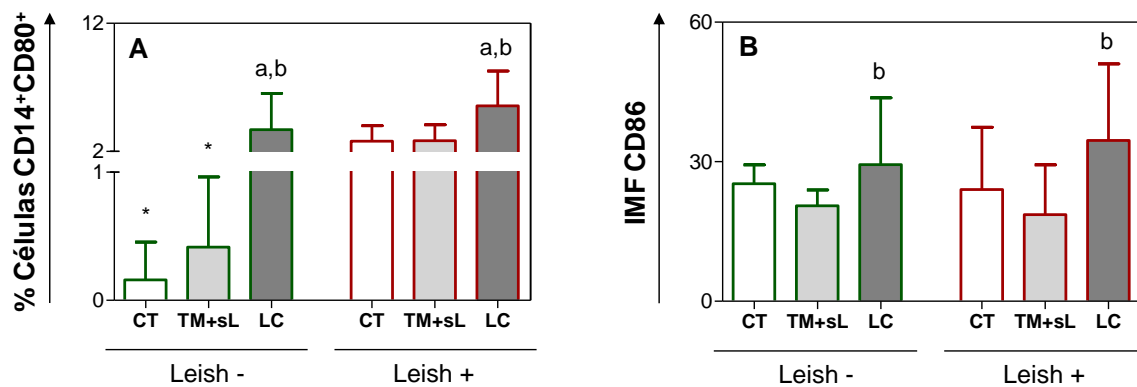
**Figura 21: Avaliação de moléculas de ativação em monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23).** Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil da intensidade média de fluorescência (IMF) de HLA-DR (A), MHC-I (B) e percentual de CD23 (C) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> estão representadas por asterisco (\*).

*5.1.1.3 Avaliação de moléculas de co-estimulação (CD80 e CD86) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> (Leish<sup>-</sup>) e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> (Leish<sup>+</sup>) do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de L. (V.) braziliensis*

O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de moléculas de co-estimulação (CD80 e CD86) em monócitos circulantes Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de pacientes portadores de leishmaniose cutânea e o impacto que a internalização de formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* teria na expressão desses marcadores. As moléculas de co-estimulação avaliadas foram analisadas pelo percentual (CD80) e IMF (CD86) de monócitos positivos para esses marcadores (Figuras 22A, 22B respectivamente).

A análise dos resultados demonstrou que monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> do grupo LC apresentaram maior percentual de CD80 em relação as mesmas populações celulares dos

grupos CT e TM<sup>+</sup>sL (Figura 22A). Além disso, verificou-se que monócitos Leish<sup>-</sup> dos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL<sup>+</sup> apresentaram menor percentual dessa molécula em relação a monócitos Leish<sup>+</sup> dos mesmos grupos (Figura 22A). A avaliação de CD86 mostrou que monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> do grupo LC apresentaram maior IMF desse marcador em relação as mesmas populações celulares do grupo TM<sup>+</sup>sL (Figura 22B).



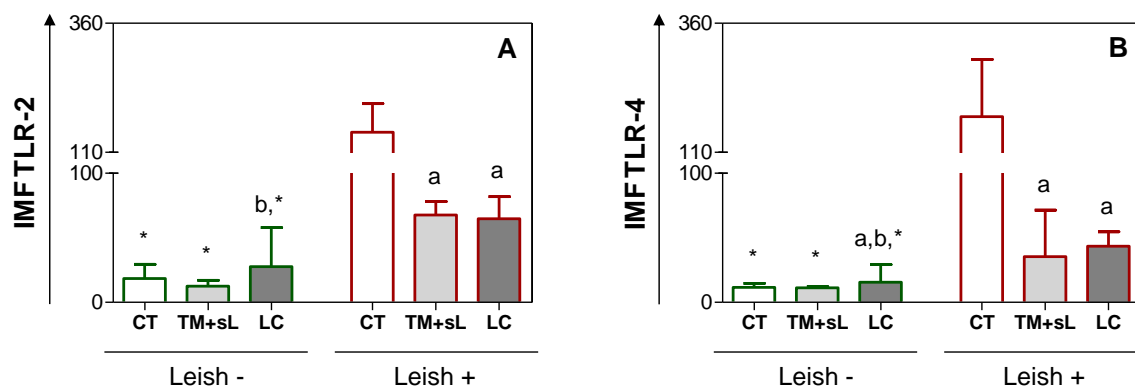
**Figura 22: Avaliação de moléculas de co-estimulação em monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23).** Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do percentual de CD80 (A) e intensidade média de fluorescência (IMF) de CD86 (B) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> estão representadas por asterisco (\*).

#### 5.1.1.4 Avaliação de receptores Toll (TLR-2 e TLR-4) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> (Leish<sup>-</sup>) e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> (Leish<sup>+</sup>) do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*

A ativação de TLRs corresponde um dos primeiros sistemas de defesa contra microorganismos invasores (Tuon et al. 2008). Nesse contexto, a análise desses receptores em monócitos circulantes Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de pacientes portadores de LC foi realizada com o intuito de avaliar o impacto que a internalização de formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* teria na expressão desses marcadores. Os receptores TLR-2 e TLR-4 foram analisados pela IMF de monócitos positivos para esses marcadores (Figuras 23A, 23B respectivamente).

A análise de TLRs mostrou que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo LC apresentaram maior IMF de TLR-2 em relação ao grupo TM<sup>+</sup>sL. Além disso, observou-se que monócitos Leish<sup>+</sup> dos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram menor IMF de TLR-2 quando comparado ao grupo CT

(Figura 23A). A análise de TLR-4 mostrou que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo LC apresentaram maior IMF dessa molécula em relação aos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL (Figura 23B). Além disso, verificou-se que monócitos Leish<sup>+</sup> dos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram menor IMF de TLR-4 quando comparado ao grupo CT (Figura 23B). Por fim, observou-se que monócitos Leish<sup>-</sup> dos grupos CT, TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram menor IMF de TLR-2 e TLR-4 em relação a monócitos Leish<sup>+</sup> dos mesmos grupos (Figura 23B).



**Figura 23: Avaliação de receptores Toll em monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23).** Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil da intensidade média de fluorescência (IMF) dos receptores TLR-2 (A) e TLR-4 (B) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> estão representadas por asterisco (\*).

#### 5.1.1.5 Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas (IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$ ) em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> (Leish<sup>-</sup>) e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> (Leish<sup>+</sup>) do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, após interação com promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*

Já foi descrito na literatura que durante o processo de desenvolvimento da resposta imunológica na LC ocorre aumento da expressão de determinados receptores, bem como secreção de citocinas e fatores quimiotáticos que promovem ativação e recrutamento de monócitos circulantes para o foco inflamatório, onde se diferenciam em macrófagos (Baratta-Masini et al. 2007).

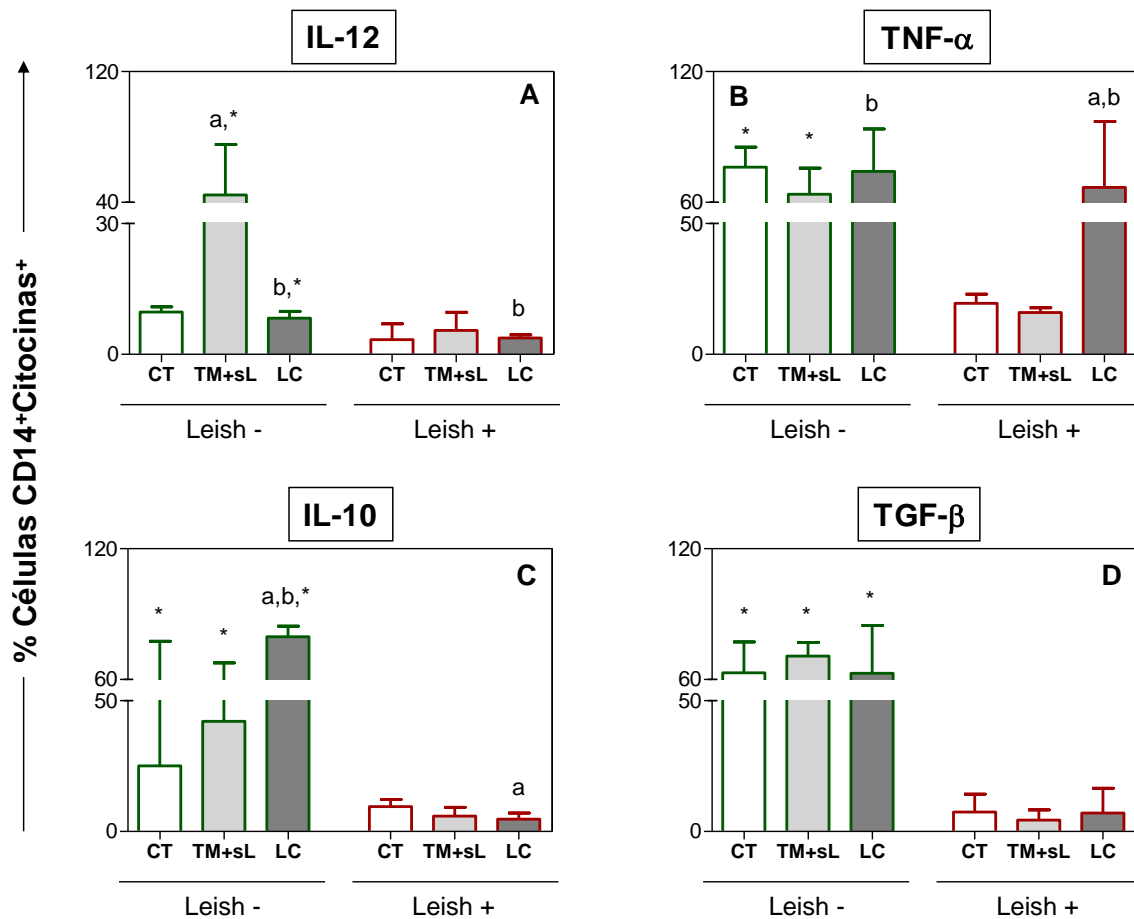
Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos circulantes Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de pacientes portadores de LC e o impacto que a internalização de formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* teria

nesse contexto. As citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$  foram analisadas pelo percentual de monócitos positivos para essas moléculas (Figuras 24A, 24B, 24C, 24D respectivamente).

A análise do perfil de citocinas mostrou que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior percentual de IL-12 em relação ao grupo CT (Figura 24A). Além disso, observou-se que monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> do grupo LC apresentaram menor percentual dessa molécula quando comparado as mesmas populações celulares do grupo TM<sup>+</sup>sL (Figura 24A). A avaliação dos resultados mostrou também que monócitos Leish<sup>-</sup> dos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram maior percentual de IL-12 em relação a monócitos Leish<sup>+</sup> dos mesmos grupos (Figura 24A). A análise dos resultados mostrou que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo LC apresentaram maior percentual de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo TM<sup>+</sup>sL (Figura 24B). Além disso, verificou-se que monócitos Leish<sup>+</sup> do grupo LC apresentaram maior percentual dessa molécula em relação aos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL (Figura 24B). A análise dos dados mostrou também que monócitos Leish<sup>-</sup> dos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior percentual de TNF- $\alpha$  em relação a monócitos Leish<sup>+</sup> dos mesmos grupos (Figura 24B).

A avaliação de IL-10 mostrou que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo LC apresentaram maior percentual dessa molécula em relação aos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL (Figura 24C). Por outro lado, verificou-se que monócitos Leish<sup>+</sup> do grupo LC apresentaram menor percentual de IL-10 em relação ao grupo CT (Figura 24C). Além disso, observou-se que monócitos Leish<sup>-</sup> dos grupos CT, TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram maior percentual dessa molécula em relação a monócitos Leish<sup>+</sup> dos mesmos grupos (Figura 24C). Por fim, os resultados mostraram também que monócitos Leish<sup>-</sup> dos grupos CT, TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram maior percentual de TGF- $\beta$  em relação a monócitos Leish<sup>+</sup> dos mesmos grupos (Figura 24D).





**Figura 24:** Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23). Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do percentual das citocinas IL-12 (A), TNF-α (B), IL-10 (C) e TGF-β em células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre células Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> estão representadas por asterisco (\*).

### 5.1.2 Avaliação do perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa

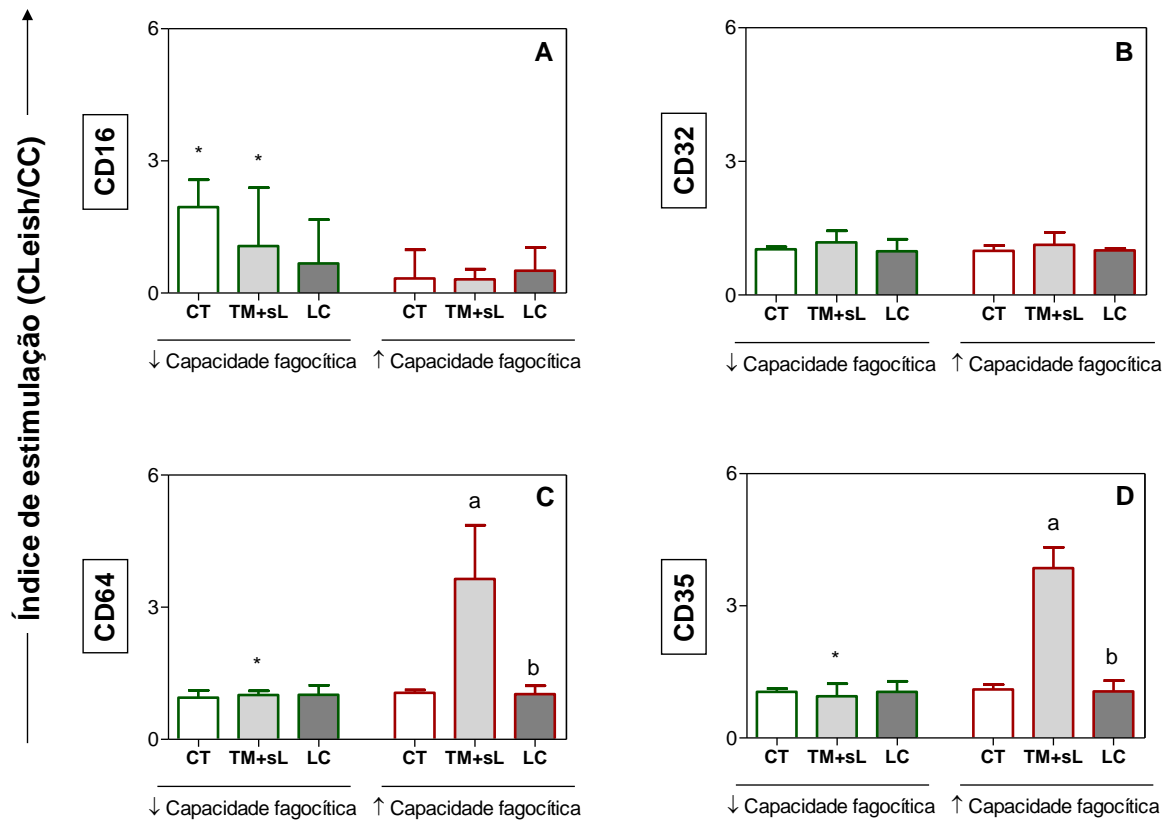
Após verificar o impacto que a interação monócitos circulantes/promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* teria na expressão/síntese dos marcadores e citocinas avaliados, o presente estudo teve como objetivo avaliar dos pacientes cujos monócitos foram capazes de internalizar promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* se havia um perfil fenotípico-funcional diferenciado quando eles fossem subcategorizados em dois grupos de acordo com sua capacidade fagocítica. Para alcançar o objetivo proposto criou-se um índice denominado “Capacidade Fagocítica Relativa”, onde pacientes dos grupos CT, TM<sup>+</sup>sL e LC foram

segregados, baseado na mediana dos valores, em duas categorias: *Baixa* ou *Alta* capacidade fagocítica, conforme *item 4.7.7* descrito na metodologia. É importante mencionar que todos os valores utilizados na obtenção dos próximos resultados foram provenientes do *Índice de Estimulação (IE)* obtido pelo cálculo da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle.

### *5.1.2.1 Avaliação de receptores Fcγ (CD16, CD32 e CD64) e receptor do Complemento (CD35) em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa*

A análise do perfil de receptores Fcγ (CD16, CD32 e CD64) demonstrou que monócitos de pacientes com ↓ capacidade fagocítica dos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior IE de CD16 em relação a monócitos com ↑ capacidade fagocítica dos mesmos grupos (Figura 25A). A análise dos resultados mostrou que monócitos de pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior IE de CD64 e CD35 em relação ao grupo CT (Figuras 25C, 25D respectivamente). Além disso, observou-se também que monócitos de pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram menor IE de CD64 e CD35 quando comparado ao grupo TM<sup>+</sup>sL (Figuras 25C, 25D respectivamente). Por fim, verificou-se que monócitos de pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram menor IE de CD64 e CD35 em relação a monócitos com ↑ capacidade fagocítica do mesmo (Figuras 25C, 25D respectivamente).

Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise do receptor CD32 (Figura 25B).



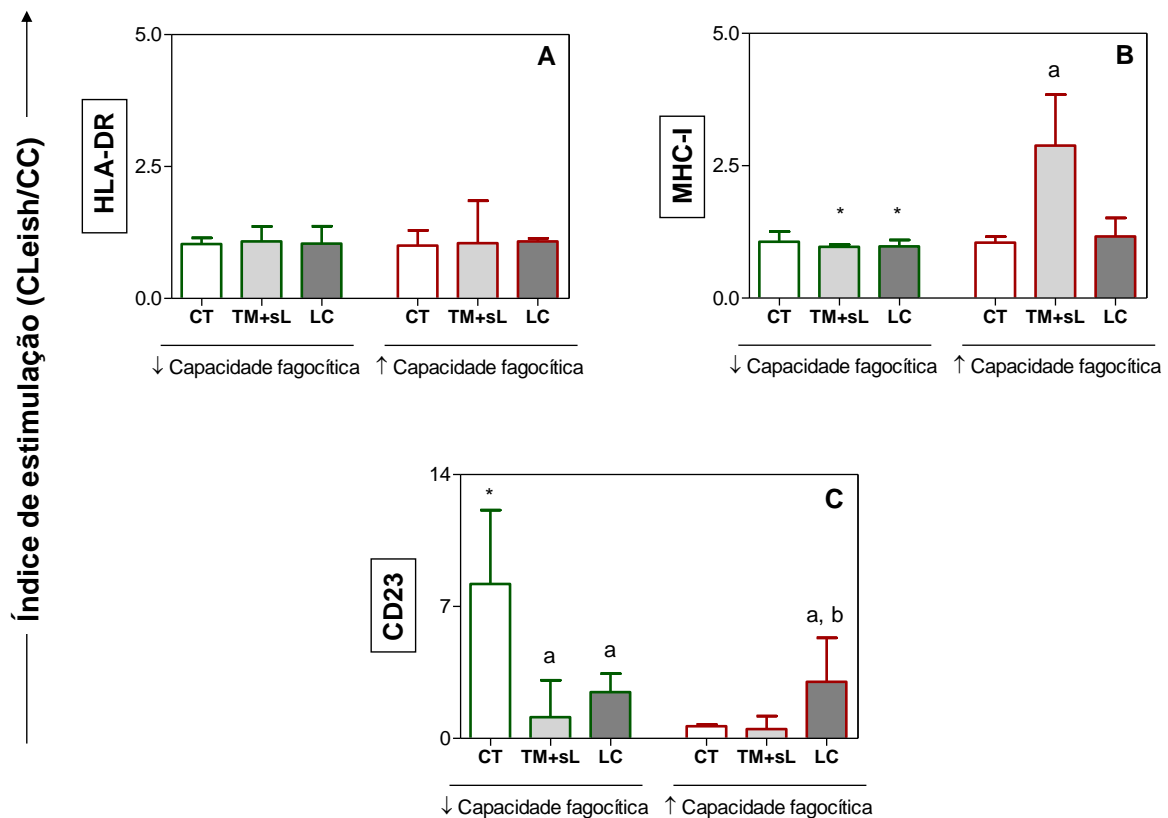
**Figura 25: Avaliação do perfil de receptores Fcγ e do complemento em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM+sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE dos receptores CD16 (A), CD32 (B), CD64 (C) e CD35 (D) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM+sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ↓ capacidade fagocítica e ↑ capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*).

#### 5.1.2.2 Avaliação de moléculas de ativação (HLA-DR, MHC-I e CD23) em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa

A análise dos resultados mostrou que monócitos de pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo TM+sL apresentaram maior IE de MHC-I em relação ao grupo CT (Figura 26B). Além disso, observou-se que monócitos de pacientes com ↓ capacidade fagocítica dos grupos TM+sL e LC apresentaram menor IE de MHC-I em relação a monócitos com ↑ capacidade fagocítica dos mesmos grupos (Figura 26B). A avaliação de CD23 mostrou que monócitos de pacientes com ↓ capacidade fagocítica dos grupos TM+sL e LC apresentaram menor IE dessa molécula em relação ao grupo CT (Figura 26C). Por outro lado, verificou-se

que monócitos de pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram maior IE de CD23 em relação aos grupos CT e TM+sL (Figura 26C). Por fim, observou-se que monócitos de pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo CT apresentaram maior IE de CD23 quando comparado a monócitos com ↑ capacidade fagocítica do mesmo grupo (Figura 26C).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise da molécula HLA-DR (Figura 26A).

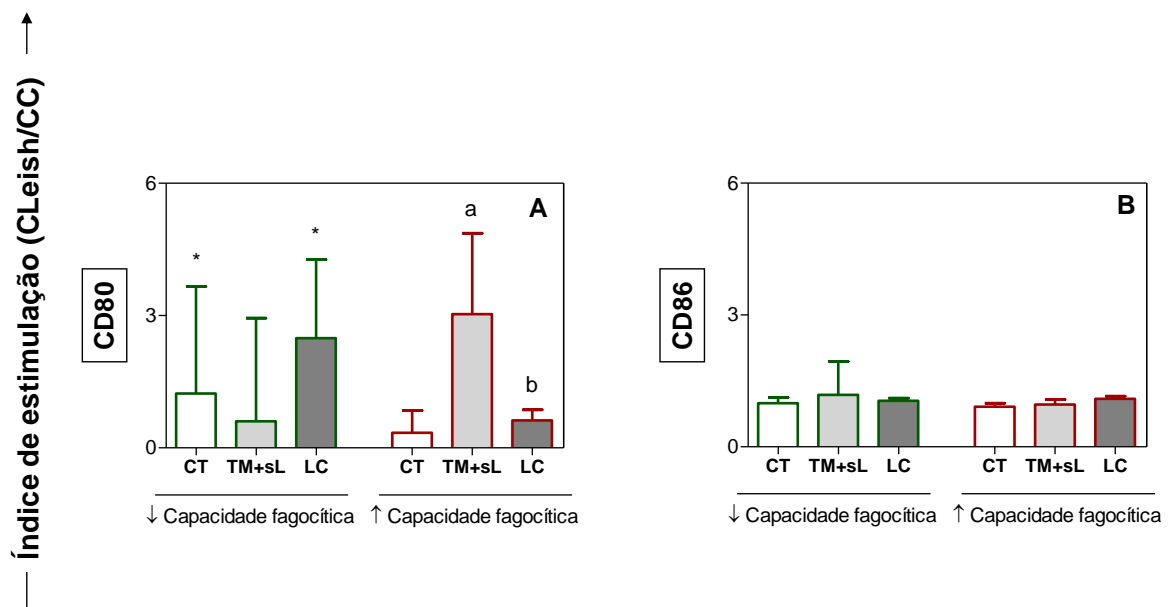


**Figura 26: Avaliação de moléculas de ativação em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM+sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE das moléculas HLA-DR (A), MHC-I (B) e CD23 (C) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM+sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ↓ capacidade fagocítica e ↑ capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*).

5.1.2.3 Avaliação de moléculas de co-estimulação (CD80 e CD86) em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa

A análise dos dados mostrou que monócitos de pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior IE de CD80 em relação ao grupo CT (Figura 27A). Além disso, observou-se que monócitos de pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram menor IE dessa molécula em relação ao grupo TM<sup>+</sup>sL (Figura 27A). Por fim, verificou-se que monócitos de pacientes com ↓ capacidade fagocítica dos grupos CT e LC apresentaram maior IE de CD80 em relação a monócitos com ↑ capacidade fagocítica dos mesmos grupos (Figura 27A).

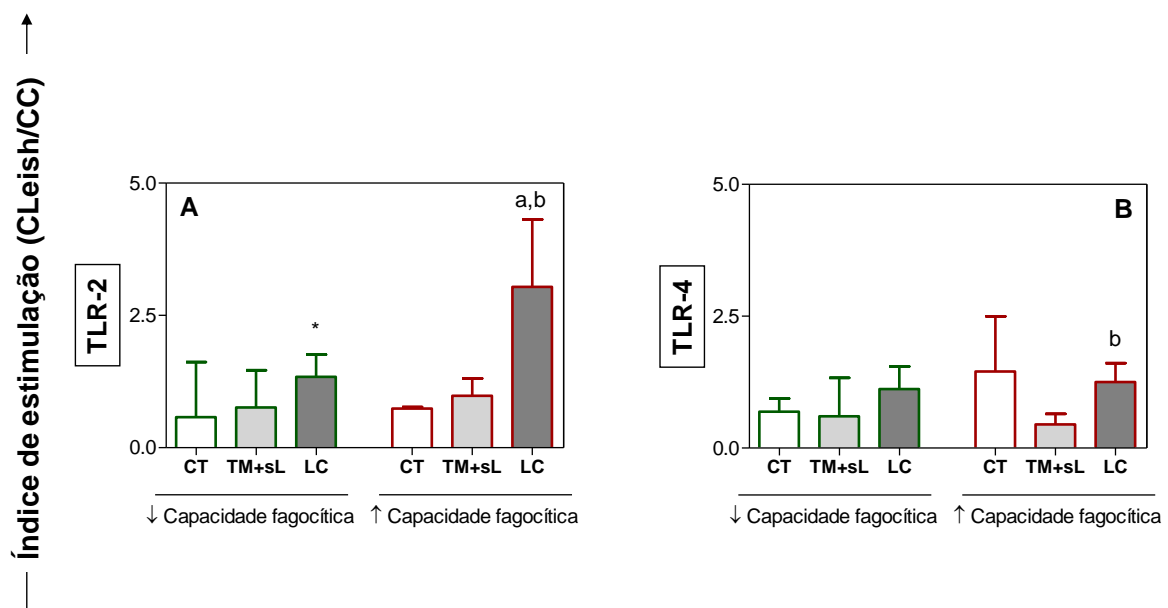
Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise da molécula CD86 (Figura 27B).



**Figura 27: Avaliação de moléculas de co-estimulação em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE das moléculas CD80 (A) e CD86 (B) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ↓ capacidade fagocítica e ↑ capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*).

5.1.2.4 Avaliação de receptores Toll (TLR-2 e TLR-4) em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa

A avaliação de TLRs mostrou que monócitos de pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram maior IE de TLR-2 quando comparado aos grupos CT e TM+sL (Figura 28A). Os resultados mostraram também que monócitos de pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram menor IE de TLR-2 em relação a monócitos com ↑ capacidade fagocítica do mesmo grupo (Figura 28A). A análise de TLR-4 mostrou que monócitos de pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram maior IE desse receptor em relação ao grupo TM+sL (Figura 28B).



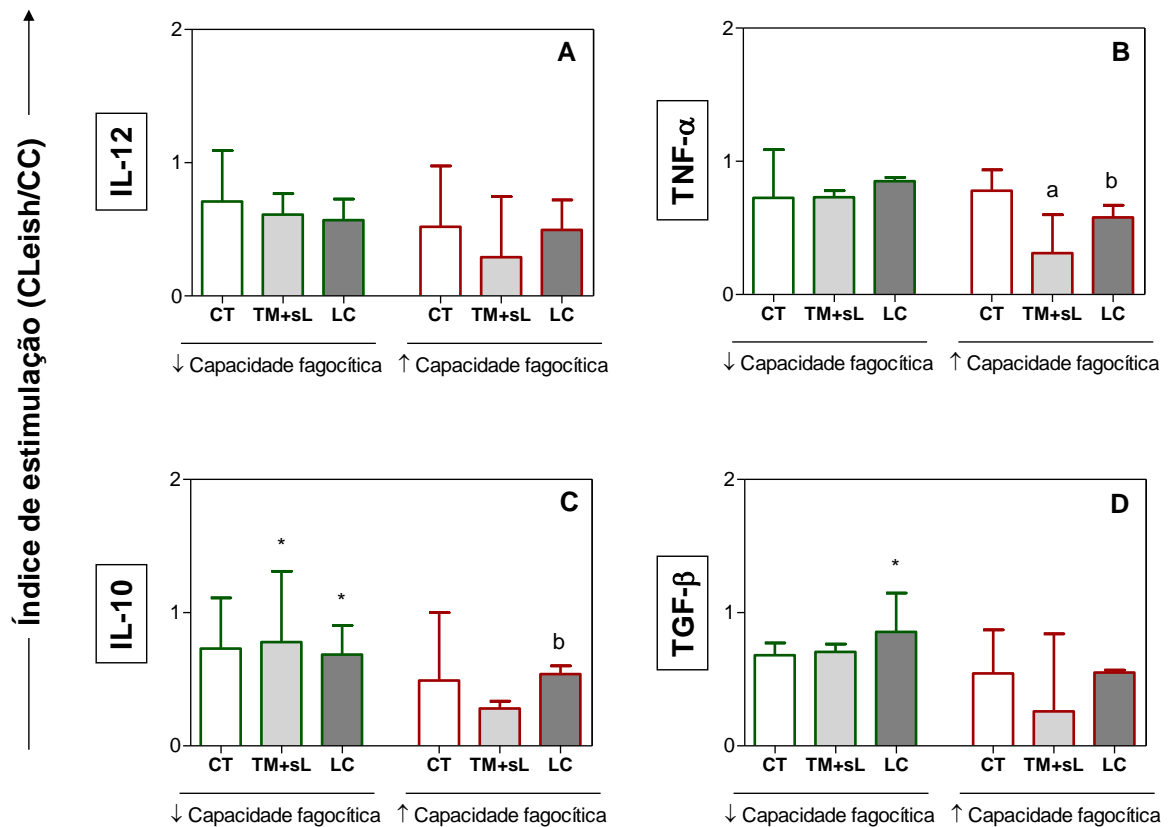
**Figura 28: Avaliação de receptores do tipo Toll em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM+sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE dos receptores TLR-2 (A) e TLR-4 (B) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM+sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ↓ capacidade fagocítica e ↑ capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*).

*5.1.2.5 Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas (IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$ ) em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa*

A análise do perfil de citocinas mostrou que monócitos de pacientes com  $\uparrow$  capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram menor IE de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo CT (Figura 29B). Além disso, observou-se que monócitos de pacientes com  $\uparrow$  capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram maior IE dessa molécula em relação ao grupo TM<sup>+</sup>sL (Figura 29B).

A análise dos dados mostrou que monócitos de pacientes com  $\uparrow$  capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram maior IE de IL-10 em relação ao grupo TM<sup>+</sup>sL (Figura 29C). Além disso, observou-se que monócitos de pacientes com  $\downarrow$  capacidade fagocítica dos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram maior IE de IL-10 em relação a monócitos com  $\uparrow$  capacidade fagocítica dos mesmos grupos (Figura 29C). Por fim, a avaliação de TGF- $\beta$  demonstrou que monócitos de pacientes com  $\downarrow$  capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram maior IE dessa citocina em relação a monócitos com  $\uparrow$  capacidade fagocítica do mesmo grupo (Figura 29D).

Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise da citocina IL-12 (Figura 29A).



**Figura 29: Avaliação de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM+sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE das citocinas IL-12 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C) e TGF- $\beta$  (D) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM+sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ↓ capacidade fagocítica e ↑ capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*).

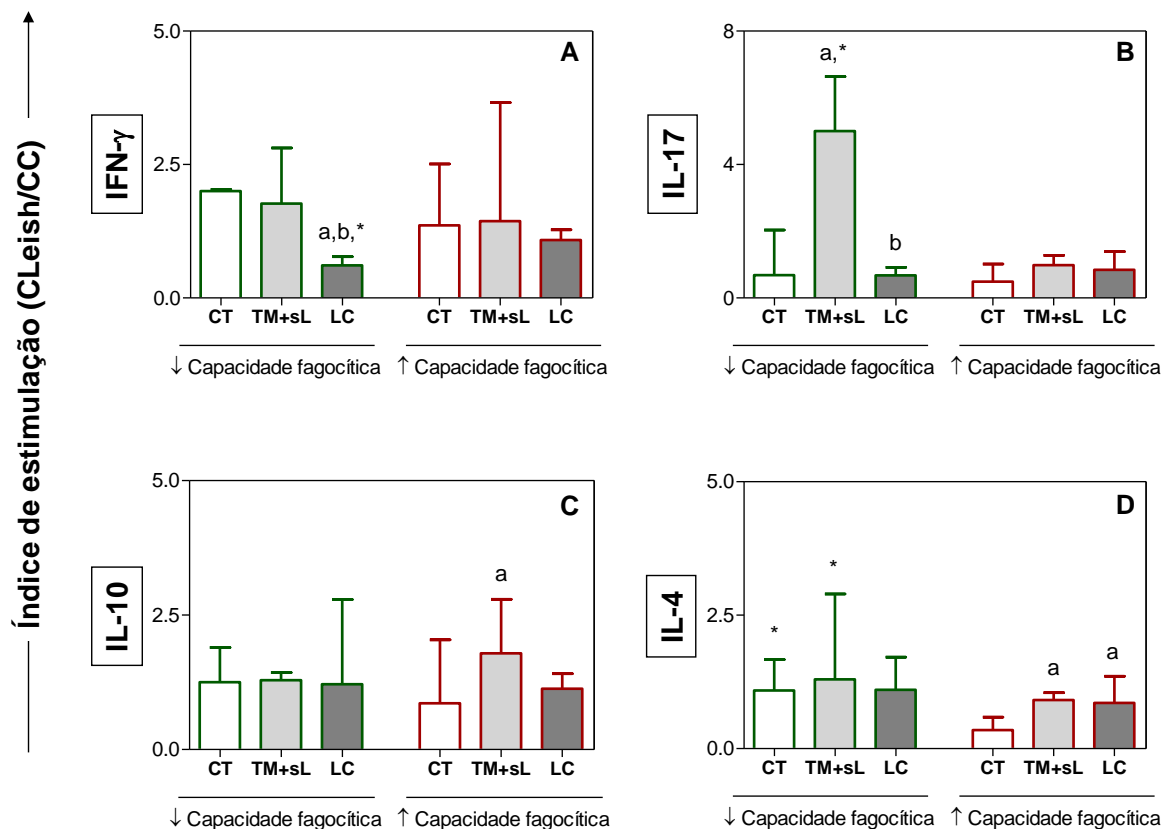
#### 5.1.2.6 Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 e IL-4) em linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa

A análise dos dados demonstrou que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram menor IE de IFN- $\gamma$  em relação aos grupos CT e TM+sL (Figura 30A). Além disso, observou-se que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram menor IE dessa citocina em relação a monócitos com ↑ capacidade fagocítica do mesmo grupo (Figura 30A). Os resultados mostraram também que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo TM+sL apresentaram maior IE de IL-17 quando comparado ao grupo CT (Figura 30B). Além disso, verificou-se que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes do grupo LC apresentaram menor IE dessa citocina em



relação ao grupo TM<sup>+</sup>sL (Figura 30D). A análise dos dados mostrou também que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior IE de IL-17 em relação a monócitos com ↑ capacidade fagocítica do mesmo grupo (Figura 30B).

A avaliação de IL-10 mostrou que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior IE dessa citocina em relação ao grupo CT (Figura 30A). Os resultados mostraram também que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com ↑ capacidade fagocítica dos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram maior IE de IL-4 em relação ao grupo CT (Figura 30D). Por fim, verificou-se que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com ↓ capacidade fagocítica dos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior IE dessa citocina em relação a monócitos com ↑ capacidade fagocítica dos mesmos grupos (Figura 30D).

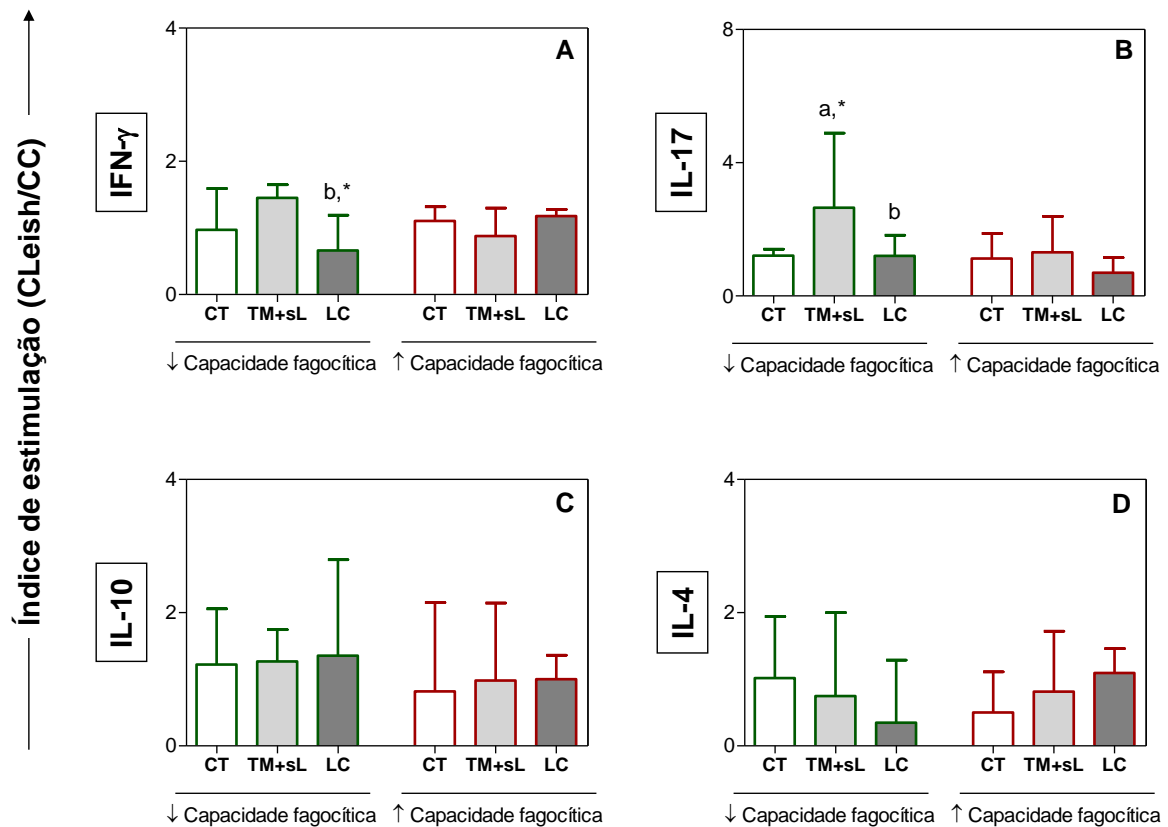


**Figura 30: Avaliação de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-17 (B), IL-10 (C) e IL-4 (D) em linfócitos T CD4<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ↓ capacidade fagocítica e ↑ capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*).

*5.1.2.7 Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas (IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-17) em linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, considerando a capacidade fagocítica relativa*

A avaliação do perfil de citocinas demonstrou que linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram menor IE de IFN- $\gamma$  em relação ao grupo TM<sup>+</sup>sL (Figura 31A). Além disso, verificou-se que linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram menor percentual dessa citocina em relação a monócitos com ↑ capacidade fagocítica do mesmo grupo (Figura 31A). A análise dos resultados mostrou que linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior IE de IL-17 em relação ao grupo CT (Figura 31B). Além disso, verificou-se que linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram menor IE dessa citocina em relação ao grupo TM<sup>+</sup>sL (Figura 31B). Por fim, observou-se que linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior percentual de IL-17 em relação a monócitos com ↑ capacidade fagocítica do mesmo grupo (Figura 31B).

Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise das citocinas IL-10 e IL-4 (Figuras 31C, 31D respectivamente).



**Figura 31: Avaliação de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23), considerando a capacidade fagocítica relativa.** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-17 (B), IL-10 (C) e IL-4 (D) em linfócitos T CD8<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ↓ capacidade fagocítica e ↑ capacidade fagocítica estão representadas por asterisco (\*).

### 5.1.3 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea

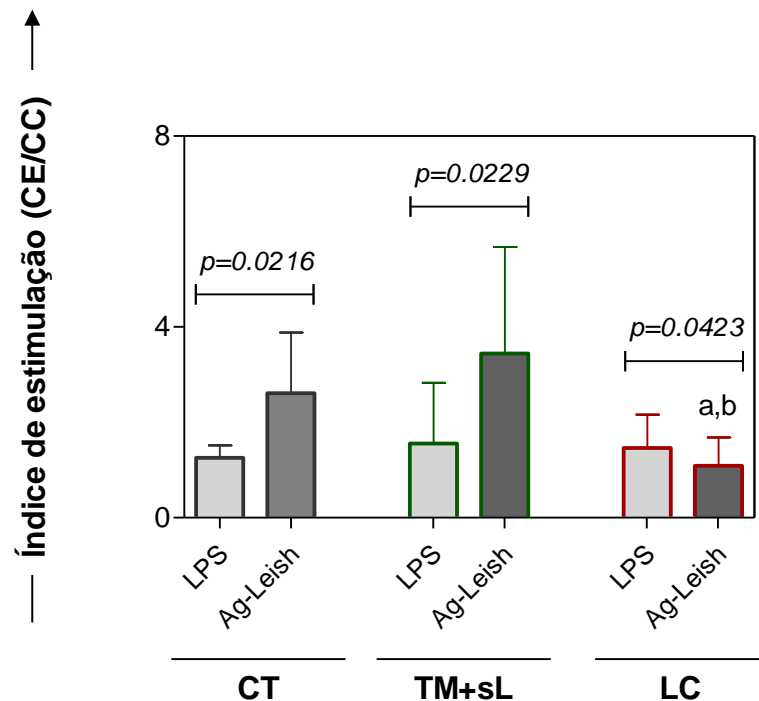
Segundo alguns autores, o NO produzido durante processos inflamatórios, principalmente por macrófagos ativados, possui ação citotóxica/citostática capaz de promover destruição de microrganismos e células tumorais (Guzik et al. 2003). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de NO intracelular por monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de LC e o impacto que estímulo específico com antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (Ag-Leish) teria nesse contexto.

A produção de NO intracelular foi analisada pelo percentual de células CD14 positivas para DAF-2T (Figura 32). É importante mencionar que todos os valores utilizados na obtenção dos resultados foram provenientes do IE obtido pelo cálculo da razão entre culturas

estimuladas por AG, LPS, Ag-Leish/cultura controle.

A análise dos resultados mostrou que pacientes dos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> na cultura estimulada por Ag-Leish em relação aos mesmos grupos das culturas estimuladas por LPS (Figura 32). Além disso, verificou-se que pacientes do grupo LC apresentaram menor IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> na cultura estimulada por Ag-Leish em relação ao mesmo grupo da cultura estimulada por LPS (Figura 32). Por fim, observou-se, na cultura estimulada por Ag-Leish, que pacientes do grupo LC apresentaram menor IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> quando comparado ao grupo CT e TM<sup>+</sup>sL (Figura 32).

Nenhuma diferença significativa foi observada na produção de NO quando os grupos foram segregados em menor ou maior capacidade fagocítica. No entanto, observou-se que pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram correlação negativa entre os níveis de TNF- $\alpha$  e o IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> após estímulo com LSA ( $r = -0,8857$  e  $p = 0,0333$ ).



**Figura 32: Avaliação dos níveis de NO intracelular em monócitos de indivíduos dos grupos Controle (CT = 15), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>sL = 15) e Leishmaniose cutânea (LC = 23).** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre culturas estimuladas por LPS e Ag-Leish/cultura controle e intervalo interquartil do IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre os estímulos LPS e Ag-Leish foram consideradas quando o valor de  $p < 0,05$ . As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TM<sup>+</sup>sL em relação ao grupo LC estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente.

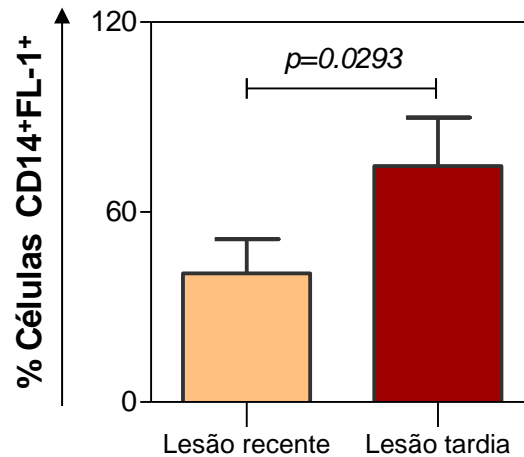
### *5.1.4 Avaliação da capacidade fagocítica e perfil fenotípico-funcional em monócitos e linfócitos T do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão*

Vários estudos têm demonstrado a influência do tempo de evolução da lesão no perfil imunológico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (Melby et al. 1994, Baratta-Masini et al. 2007, Campanelli et al. 2010, Freitas-Teixeira et al. 2012, Hejazi et al. 2012). Nesse contexto, pacientes do grupo LC foram divididos em dois subgrupos “lesão recente ( $\leq 3$  meses) e tardia ( $> 3$  meses)” com o intuito de avaliar o impacto que o tempo de evolução da lesão teria no perfil dos biomarcadores imunológicos avaliados neste estudo.

Os valores utilizados na obtenção dos próximos resultados foram provenientes do IE obtido pelo cálculo da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle.

#### *5.1.4.1 Avaliação da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea após interação com promastigotas vivas de L. (V.) braziliensis, de acordo com o tempo de evolução da lesão*

A avaliação da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de LC demonstrou que pacientes do grupo lesão recente apresentaram menor IE de células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em relação ao grupo lesão tardia - Figura 33.

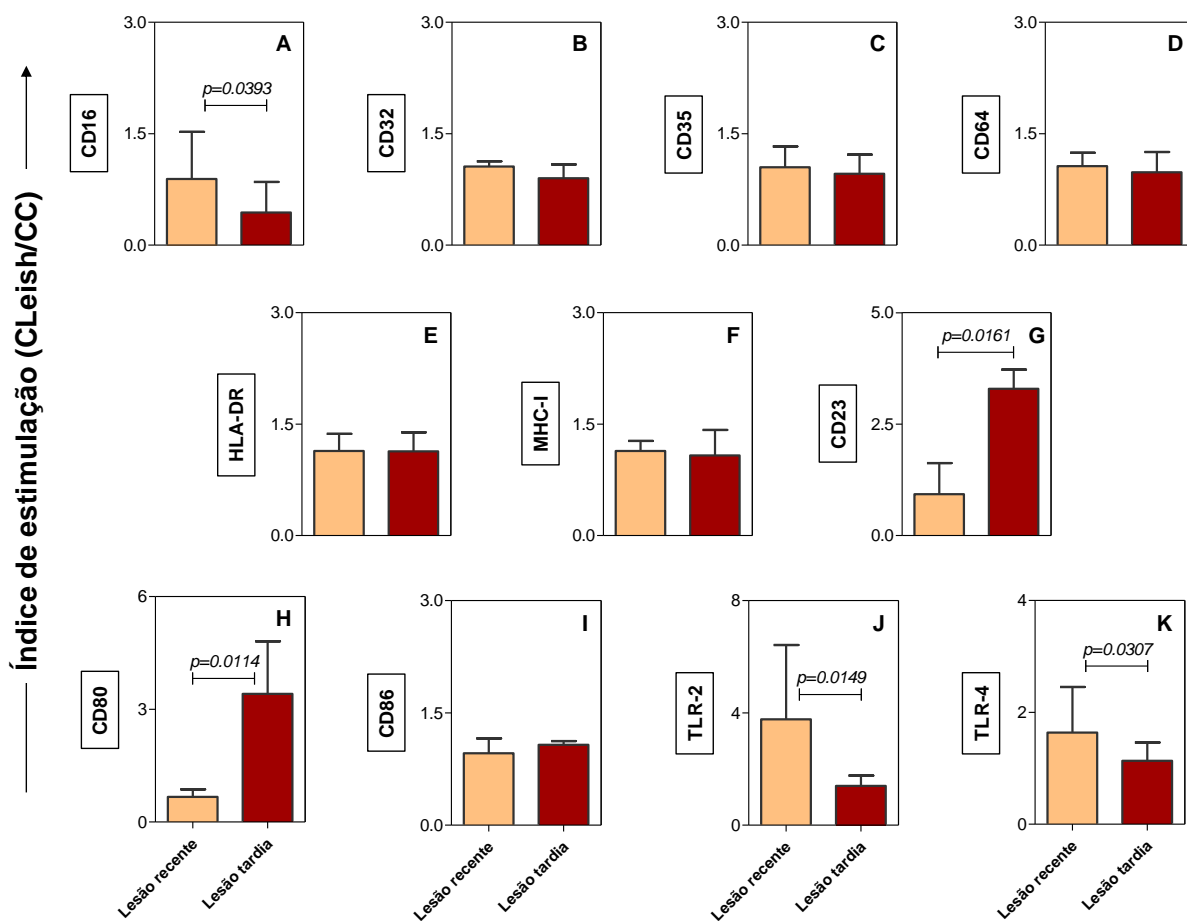


**Figura 33:** Avaliação da capacidade fagocítica de monócitos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses). Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do IE de células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras que representam os grupos lesão recente (■ = 07) e tardia (■ = 16). A diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi considerada quando o valor de  $p < 0,05$ .

#### 5.1.4.2 Avaliação de receptores $Fc\gamma$ , do Complemento e Toll, moléculas de ativação e co-estimulação em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão

A análise dos resultados mostrou que monócitos de pacientes do grupo lesão recente apresentaram maior IE de CD16, TLR-2, TLR-4 em relação ao grupo lesão tardia (Figuras 34A, 34J, 34K respectivamente). Por outro lado, observou-se que monócitos de pacientes do grupo lesão tardia apresentaram maior IE de CD23 e CD80 em relação ao grupo lesão recente (Figuras 34G, 34H respectivamente).

Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise dos demais biomarcadores avaliados.



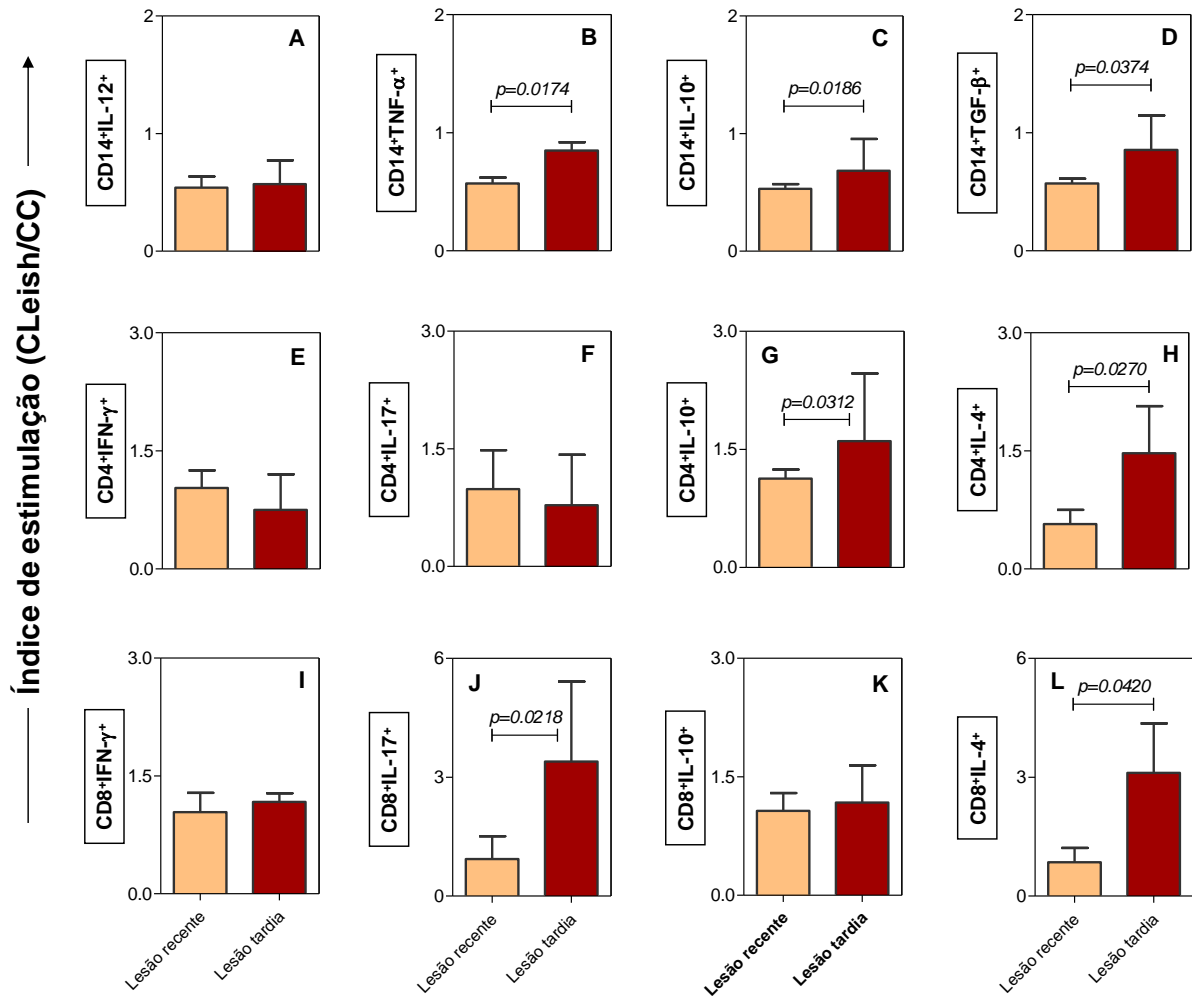
**Figura 34: Avaliação do perfil imunofenotípico em monócitos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE dos receptores  $Fc\gamma$  CD16 (A), CD32 (B) e CD64 (C), do complemento CD35 (D), moléculas de ativação HLA-DR (E), MHC-I (F) e CD23 (G), moléculas de co-estimulação CD80 (H) e CD86 (I) e receptores *Toll* TLR-2 (J) e TLR-4 (K) em células CD14<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos lesão recente (■, n = 07) e tardia (■, n = 16) foram consideradas quando o valor de  $p < 0,05$ .

#### 5.1.4.3 Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão

A análise dos dados mostrou que monócitos de pacientes do grupo lesão tardia apresentaram maior IE de TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$  em relação ao grupo lesão recente (Figuras 35B, 35C, 35D respectivamente). Além disso, verificou-se que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes do grupo lesão tardia apresentaram maior IE de IL-10 e IL-4 em relação ao grupo lesão recente (Figuras 35G, 35H respectivamente). Por fim, os resultados também mostraram que

linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes do grupo lesão tardia apresentaram maior percentual de IL-17 e IL-4 em relação ao grupo recente (Figuras 35J, 35L respectivamente).

Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise das demais citocinas avaliadas.



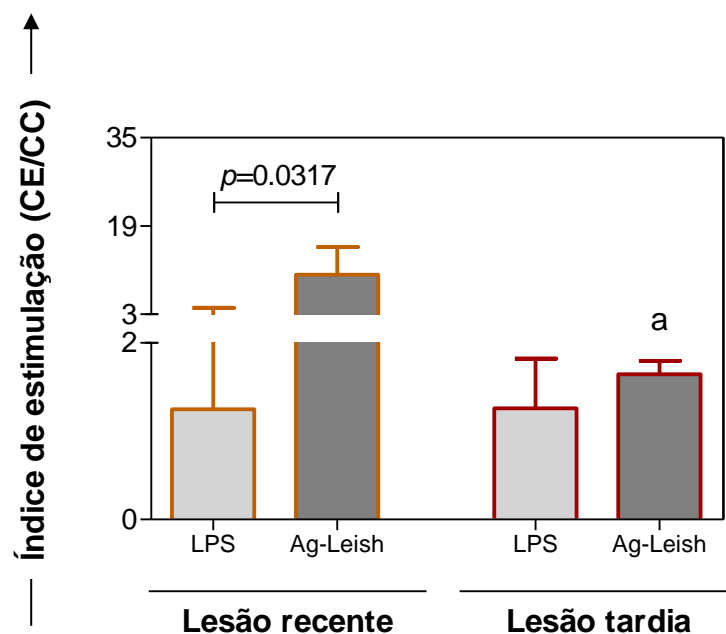
**Figura 35: Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente: ≤ 3 meses e tardia: > 3 meses).** Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre cultura estimulada por promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*/cultura controle e intervalo interquartil do IE das citocinas IL-12 (A), TNF-α (B), IL-10 (C) e TGF-β (D) em células CD14<sup>+</sup> e IFN-γ, IL-17, IL-10 e IL-4 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (E a L) em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos lesão recente (□, n = 07) e tardia (■, n = 16) foram consideradas quando o valor de p < 0,05.



5.1.4.4 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão

A análise dos resultados mostrou que pacientes do grupo lesão recente apresentaram maior IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> na cultura estimulada por Ag-Leish em relação ao mesmo grupo da cultura estimulada por LPS (Figura 36). Por fim, verificou-se, na cultura estimulada por Ag-Leish, que pacientes do grupo lesão tardia apresentaram menor IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> em relação ao grupo lesão recente (Figura 36).

Análises de correlação mostraram que pacientes do grupo lesão recente apresentaram correlação positiva entre o IE de TLR-4 e o IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> após estímulo com LSA ( $r=1,000$  e  $p=0,0167$ ).



**Figura 36:** Avaliação dos níveis de NO intracelular em monócitos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses). Os resultados estão apresentados como mediana da razão entre culturas estimuladas por LPS e Ag-Leish/cultura controle e intervalo interquartil do IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre os estímulos LPS e Ag-Leish foram consideradas quando o valor de  $p < 0,05$ . As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos lesão recente ( $n = 07$ ) e tardia ( $n = 16$ ) estão representadas pela letra **a**.

**5.2 TÓPICO II:**

*“Caracterização da resposta imune no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea”*

### 5.2.1 *Caracterização da população de estudo*

Para o estudo da resposta imune localizada utilizou-se vinte e três indígenas: cinco como grupo controle e dezoito portadores de leishmaniose cutânea. A caracterização clínica e epidemiológica desses indivíduos está descrita na Tabela 5.

Em relação ao tempo de evolução da lesão cutânea, 09 pacientes (03 mulheres e 06 homens) apresentaram lesões com até 03 meses de evolução e 09 (03 mulheres e 06 homens) apresentaram lesões com evolução superior a esse período (variação 01 a 49 meses, média  $11,6 \pm 15,2$ ). Além disso, 11 pacientes (61,1%, sendo 02 mulheres e 09 homens) apresentaram apenas uma lesão e 07 (38,9%, sendo 04 mulheres e 03 homens) mais que uma lesão. Em relação ao tipo de lesão verificou-se que 08 pacientes (44,4%, sendo 08 homens) apresentaram lesões típicas e 10 (55,6%, sendo 06 mulheres e 04 homens) atípicas.

As lesões de pacientes com mais de uma lesão estavam localizadas, principalmente, em membros inferiores e superiores. Além disso, lesões atípicas apresentaram aspecto exofítico, sem bordas bem delimitadas e geralmente recoberta por crostas.

**Tabela 5:** Caracterização da população avaliada e análise histopatológica de biópsias de pele

POPULAÇÃO AVALIADA						ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS							
Indivíduos avaliados	Idade (anos)	Gênero	Tempo de lesão (meses)	Número de lesão	Tipo de lesão	PMN	MONO	Plasmócitos	Granuloma	Necrose	Fibrose	Parasito	Classificação
CT 01	15	M	----	----	----	0	0	0	0	0	1	0	0
CT 02	36	F	----	----	----	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
CT 03	39	M	----	----	----	0	1	0	0	0	1	0	0
CT 04	61	M	----	----	----	0	1	0	0	0	1	0	0
CT 05	72	F	----	----	----	0	1	0	0	0	0	0	0
ID 43	08	F	03	01	Atípica	1	3	3	0	1	0	1	III
ID 327	09	M	06	01	Atípica	0	2	2	0	1	1	1	II
ID 339	10	F	12	02	Atípica	0	1	2	0	0	0	1	I
ID 310	14	M	49	01	Típica	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
ID 416	19	M	02	02	Típica	1	2	3	0	1	0	1	II
ID 316	20	M	24	02	Atípica	0	2	2	1	1	0	1	II
ID 333	20	M	02	01	Atípica	1	2	2	0	0	0	1	I
ID 412	21	M	02	01	Típica	0	2	1	0	0	0	1	I
ID 387	22	F	01	01	Atípica	0	2	2	0	0	0	1	I
ID 320	29	F	03	06	Atípica	0	1	0	0	0	0	0	I
ID 338	29	M	12	01	Típica	0	1	2	0	0	1	0	I
ID 317	31	F	42	03	Atípica	0	2	1	0	0	0	1	I
ID 376	33	F	04	04	Atípica	1	2	2	0	1	0	1	II
ID 380	37	M	03	01	Típica	1	3	3	1	1	0	1	III
ID 66	39	M	04	09	Típica	1	2	2	0	1	1	1	II
ID 307	41	M	36	01	Típica	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
ID 301	46	M	01	01	Típica	0	1	0	0	0	0	0	I
ID 32	73	M	03	01	Atípica	1	1	2	0	0	0	1	I

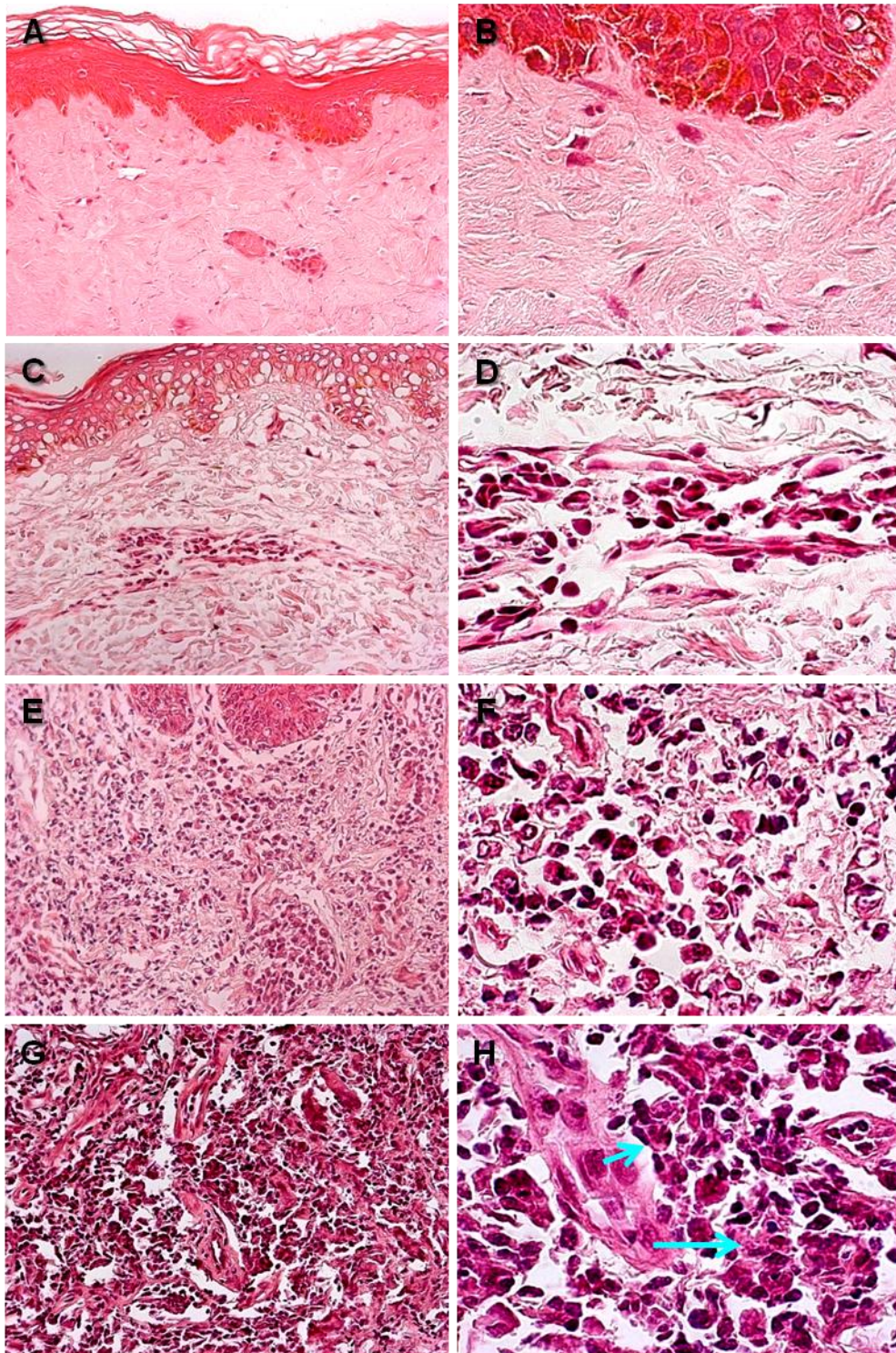
0 - Negativo ou ausente, 1 - Leve, 2 - Moderado, 3 - Acentuado; 0 - Negativo ou ausente, 1 - Positivo ou presente; Magalhães et al. (1986a): 0 - Não classificável, I - Reação exsudativa celular, II - Reação exsudativa e necrótica, III - Reação exsudativa e necroticogranulomatosa.

Abreviações: CT - Indivíduos utilizados como controle; LC - Pacientes indígenas com leishmaniose cutânea. PMN - Polimorfonucleares; MONO - Mononucleares. NR - Não realizado.

### 5.2.2 *Análise histopatológica*

Os principais achados histopatológicos do presente estudo estão sumarizados na tabela 5 e figura 35. Nenhuma alteração inflamatória foi observada em indivíduos do grupo controle (Tabela 5 e Figura 37A e 37B). Por outro lado, a análise histopatológica de pacientes portadores de leishmaniose cutânea evidenciou padrões distintos de resposta inflamatória e presença do parasito em 81,3% das amostras (Tabela 5). Além disso, observou-se distribuições dérmicas perivascular e superficial de infiltrado linfocitário (Figuras 37C e 37D) e difusa e profunda de infiltrado inflamatório misto, rico em linfócitos, plasmócitos e histiócitos, por vezes fagocitando amastigotas (Figuras 37E a 37H). Dos oito pacientes (LC01, LC02, LC05 to LC07, LC13 a LC15) com resposta inflamatória mista mais intensa, difusa e rica em linfócitos e plasmócitos, observou-se presença de necrose e granulomas com células gigantes multinucleadas em 87,5% e 25,0% dos casos, respectivamente (Tabela 5).

Por fim, a categorização de acordo com o tempo de evolução da lesão mostrou que grande parte dos pacientes do grupo lesão recente (55,6%) apresentou infiltrado inflamatório composto por células mononucleares e polimorfonucleares, enquanto no grupo lesão tardia (71,4%) observou-se predomínio de células mononucleares. Não verificou-se nenhuma diferença significativa para os demais parâmetros avaliados. Além disso, nenhuma diferença evidente foi observada quando os pacientes foram categorizados de acordo com o número (uma e > uma lesão) e tipo (típica e atípica) de lesões.



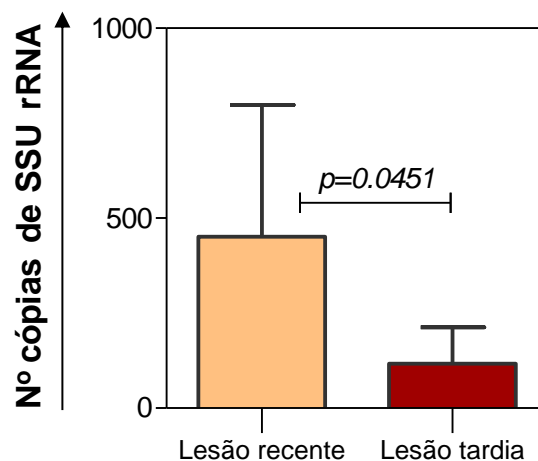
**Figura 37: Análise histopatológica da população avaliada.** As Figuras 1A e 1B representam fotomicroscopias de paciente do grupo controle com hiperqueratose e hiperplasia focal de queratinócitos basais. Ausência de infiltrado inflamatório. 1C e 1D representam paciente portador de leishmaniose cutânea (LC) com leve hiperqueratose e reação exsudativa com discreto infiltrado inflamatório mononuclear, composto predominantemente por linfócitos e plasmócitos. 1E e 1F representam paciente portador de LC com reação exsudativa caracterizada por necrose focal e moderado infiltrado inflamatório misto, rico em linfócitos, plasmócitos e histiócitos. 1G e 1H representam paciente portador de LC com reação exsudativa e necrótico-granulomatosa caracterizada por acentuado infiltrado inflamatório misto, rico em linfócitos, plasmócitos e histiócitos. Presença de células gigantes multinucleadas (seta curta) e de amastigotas intracelulares (seta longa). As lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina (H&E). **Painel à esquerda:** fotomicroscopias com ampliação de 20x; **Painel à direita:** fotomicroscopias com ampliação de 63x.

5.2.3 *Quantificação da carga parasitária no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão*

O presente estudo teve como objetivo quantificar a carga parasitária no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão. A quantidade de parasitos foi determinada por normalização com o número de cópias do gene constitutivo *ACTB*, conforme Overbergh et al. (1999) e Gomes et al. (2012).

A análise da carga parasitária no infiltrado inflamatório mostrou que pacientes do grupo lesão recente apresentaram maior número de cópias de SSU rRNA em relação ao grupo lesão tardia - Figura 38.

Análises de correlação demonstraram no grupo lesão tardia correlação negativa entre o número de cópias de SSU rRNA e o IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> após estímulo com LSA ( $r = -0,7295$  e  $p = 0,0166$ ).



**Figura 38: Quantificação da carga parasitária em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil do número de cópias de SSU rRNA em formato de gráficos de barras que representam os grupos lesão recente (■ = 07) e tardia (■ = 10). A diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi considerada quando o valor de  $p < 0,05$ .

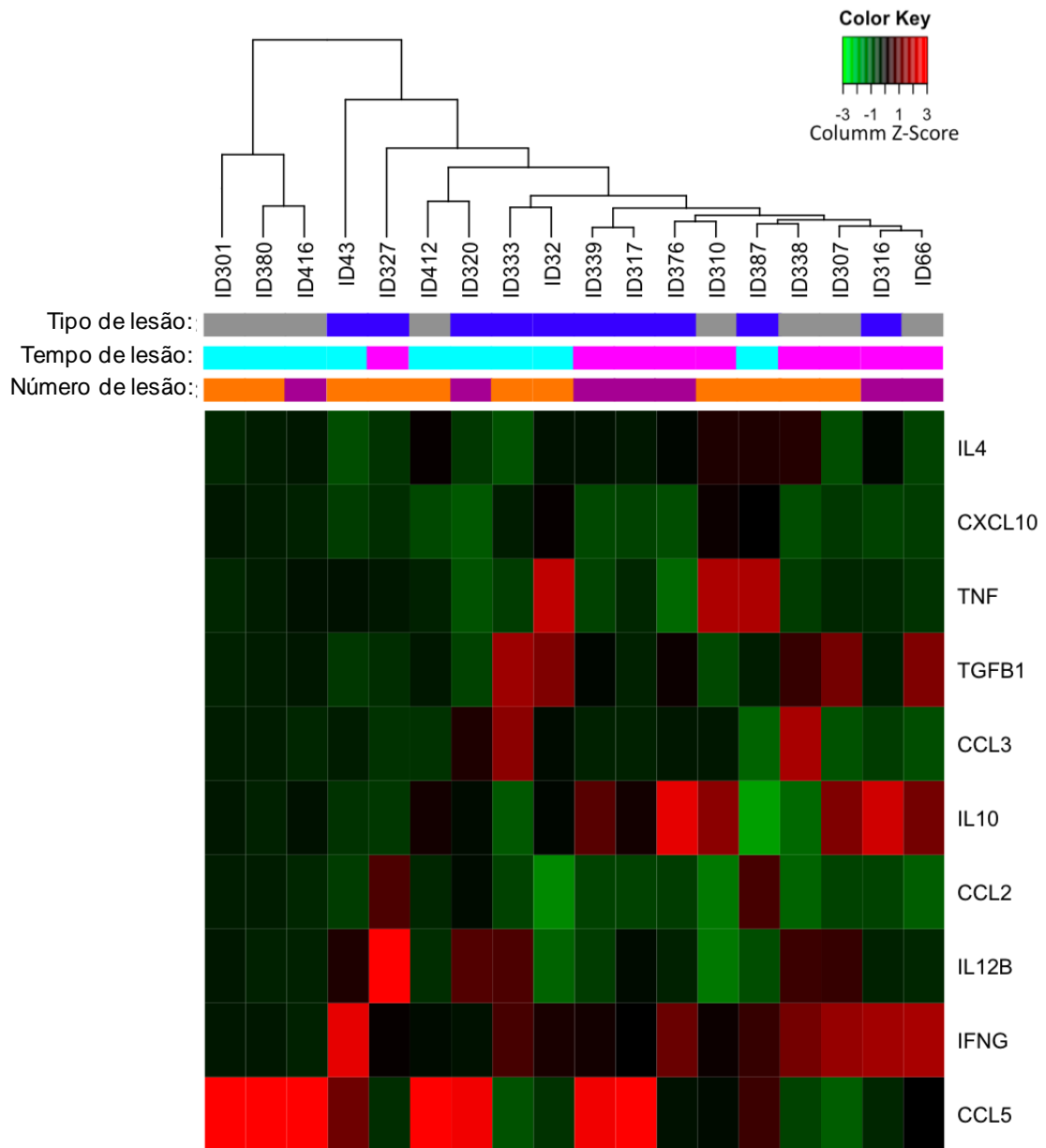
5.2.4 *Análise por Heat map e agrupamento hierárquico*

Com o intuito de verificar associação entre o perfil de expressão gênica do infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea às estratificações: tempo de evolução (recente e tardia), número (uma e  $>$  uma lesão) e tipo (típica e atípica) de

lesões, construiu-se uma matriz representada por um heat map (Figura 39), considerando-se todos os biomarcadores imunológicos avaliados no estudo de resposta imune localizada. Essa abordagem demonstrou que o tempo de evolução da lesão teve grande impacto nos níveis de expressão gênica observados, permitindo segregar perfil imunológico distinto entre seus subgrupos. Nesse contexto, o grupo lesão recente destacou-se por maiores níveis de expressão de CCL5, enquanto o grupo lesão tardia por maiores níveis de expressão de IFNG e IL10.

Por outro lado, verificou-se que o número e tipo de lesões não apresentaram associação com perfil de expressão gênica avaliado, não permitindo segregação evidente entre seus subgrupos. Diante do exposto, as próximas análises do presente estudo considerarão somente o tempo de evolução da lesão como parâmetro a ser avaliado.





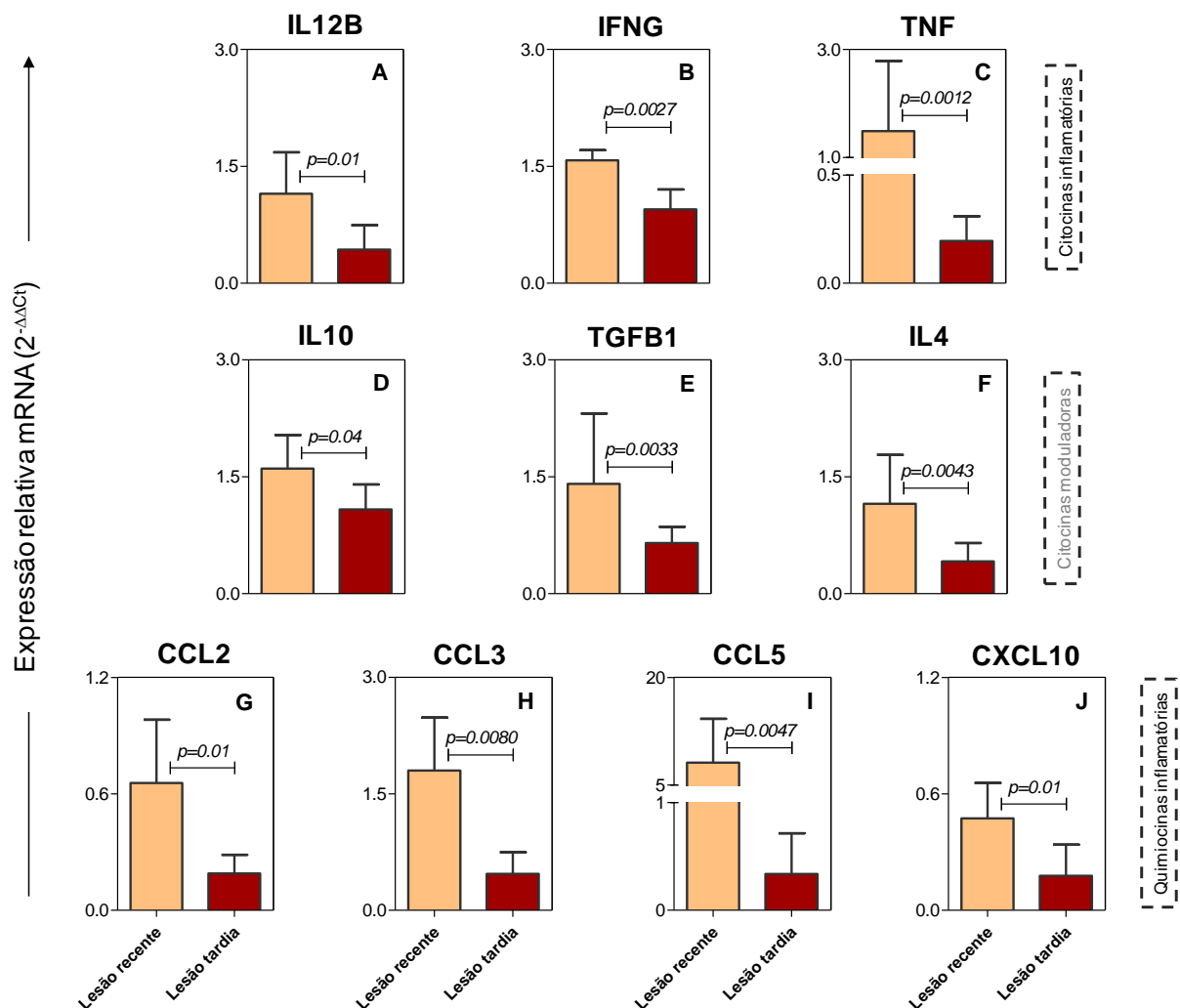
**Figura 39: Heat map e agrupamento hierárquico de genes expressos em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), segundo tipo, tempo e número de lesão, respectivamente.** A expressão relativa dos genes avaliados foi apresentada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  e os dados plotados foram convertidos para *score-Z*. Os pacientes foram estratificados por tipo (cinza representa lesões típicas e azul atípicas), tempo (ciano representa lesões recentes e magenta tardias) e número de lesões (laranja representa uma e violeta mais do que uma lesão).

### 5.2.5 Perfil de expressão gênica no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão

A avaliação do perfil de expressão gênica no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea foi realizada com o intuito de avaliar o impacto que o tempo de evolução da lesão teria nos níveis de transcritos de citocinas e quimiocinas

inflamatórias (IL12B, IFNG, TNF, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10) e moduladoras (IL10, TGFB1, IL4).

A análise dos dados mostrou que pacientes do grupo lesão recente apresentaram maiores níveis de transcritos de todas as citocinas e quimiocinas avaliadas em relação ao grupo lesão tardia (Figuras 40A a 40J).



**Figura 40: Perfil de expressão gênica em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** Níveis de transcritos de citocinas e quimiocinas inflamatórias (IL12B, IFNG, TNF, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10 - A a C, G a J) e moduladoras (IL10, TGFB1, IL4 - D a F) no infiltrado inflamatório de pacientes dos grupos lesão recente (■ = 09) e tardia (■ = 09). Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos lesão recente e tardia foram consideradas quando o valor de  $p < 0,05$ .

*5.2.6 Perfil panorâmico de citocinas e quimiocinas inflamatórias/moduladoras no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão*

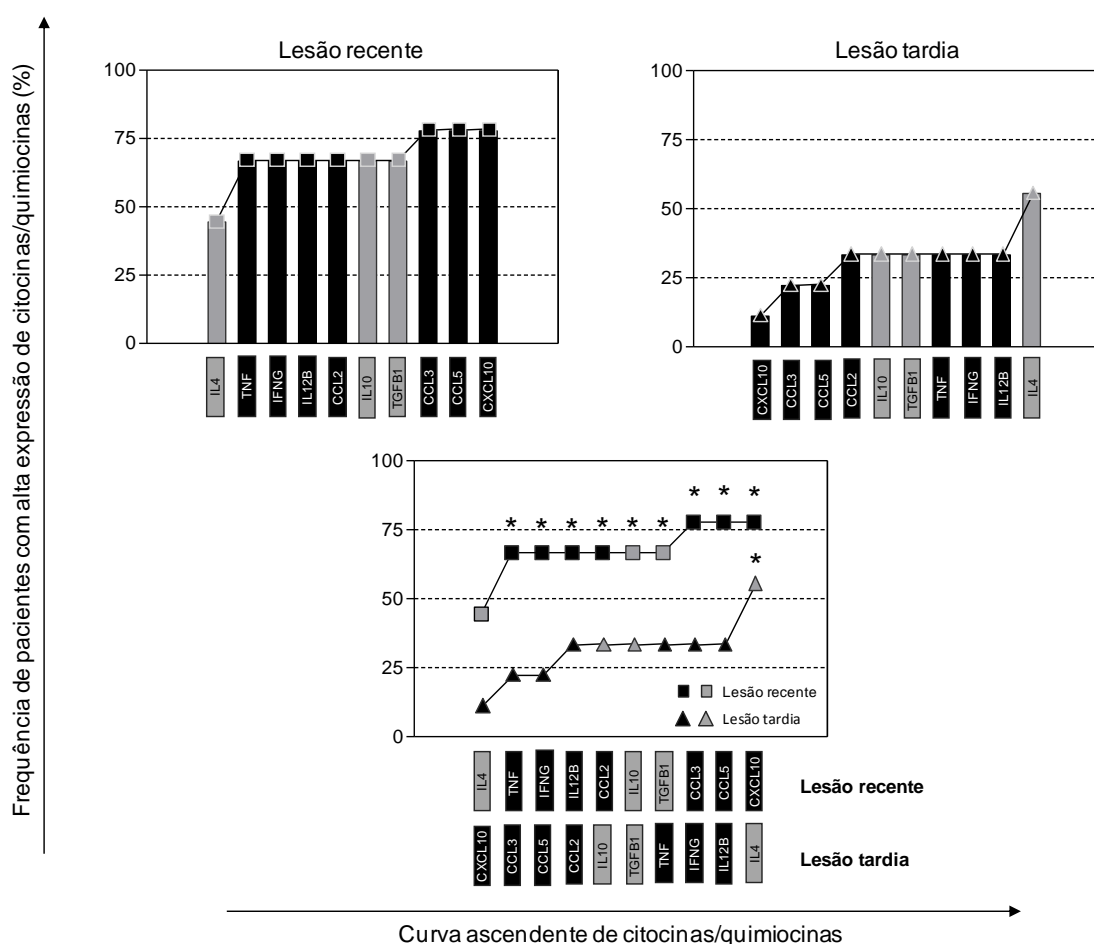
Com o intuito de melhor caracterizar a resposta imune localizada nas lesões dos pacientes avaliados, determinou-se o perfil panorâmico de expressão gênica relativa de citocinas e quimiocinas, considerando o tempo de evolução da lesão. Para esse propósito, primeiramente delineou-se a assinatura global dos genes que apresentaram alta expressão de mRNA de citocinas/quimiocinas inflamatórias/moduladoras de acordo com a frequência ascendente determinada.

A análise dos dados mostrou que pacientes do grupo lesão recente apresentaram perfil inflamatório com evidente modulação, principalmente devido aos maiores níveis de expressão dos genes IL10, TGFB1, CCL3, CCL5 e CXCL10. Além disso, observou-se que pacientes do grupo lesão tardia apresentaram perfil imunológico balanceado com proeminente participação de IL4 e discreta de TNF, IFNG e IL12B.

A avaliação das curvas ascendentes da expressão gênica relativa de citocinas e quimiocinas mostrou que o grupo lesão recente foi caracterizado pela sequência ascendente IL4 < TNF = IFNG = IL12B = CCL2 = IL10 = TGFB1 < CCL3 = CCL5 = CXCL10, enquanto que o grupo lesão tardia apresentou sequência CXCL10 < CCL3 = CCL5 < CCL2 = IL10 = TGFB1 = TNF = IFNG = IL12B < IL-4 (Figura 41, topo).

A análise de sobreposição das assinaturas mostrou que pacientes do grupo lesão tardia apresentaram menor expressão de todas citocinas e quimiocinas avaliadas (exceto IL4), quando comparado ao grupo lesão recente. A análise de IL4 mostrou maior expressão dessa citocina no grupo lesão tardia quando comparado ao grupo lesão recente (Figura 41, rodapé).

**Assinatura global de citocinas e quimiocinas moduladoras/anti-inflamatória/inflamatórias**



**Figura 41: Perfil panorâmico da expressão gênica relativa de citocinas e quimiocinas em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente:  $\leq 3$  meses e tardia:  $> 3$  meses).** O perfil global das citocinas/quimiocinas reguladoras/anti-inflamatória IL10, TGFB1, IL4 (■) e inflamatórias IL12B, IFNG, TNF, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10 (■) está representado por uma curva ascendente da frequência de pacientes que apresentam alta expressão de mRNA dos genes avaliados. A análise comparativa do perfil panorâmico de citocinas e quimiocinas entre os grupos lesão recente (—■—) e tardia (—▲—) foi realizada por sobreposição das assinaturas (rodapé). As linhas pontilhadas destacam os percentis 25, 50 e 75 usados como referência para análises comparativas. Diferenças significativas foram consideradas quando a frequência de determinada citocina/quimiocina ultrapassou o percentil 50, representada por um asterisco (\*).

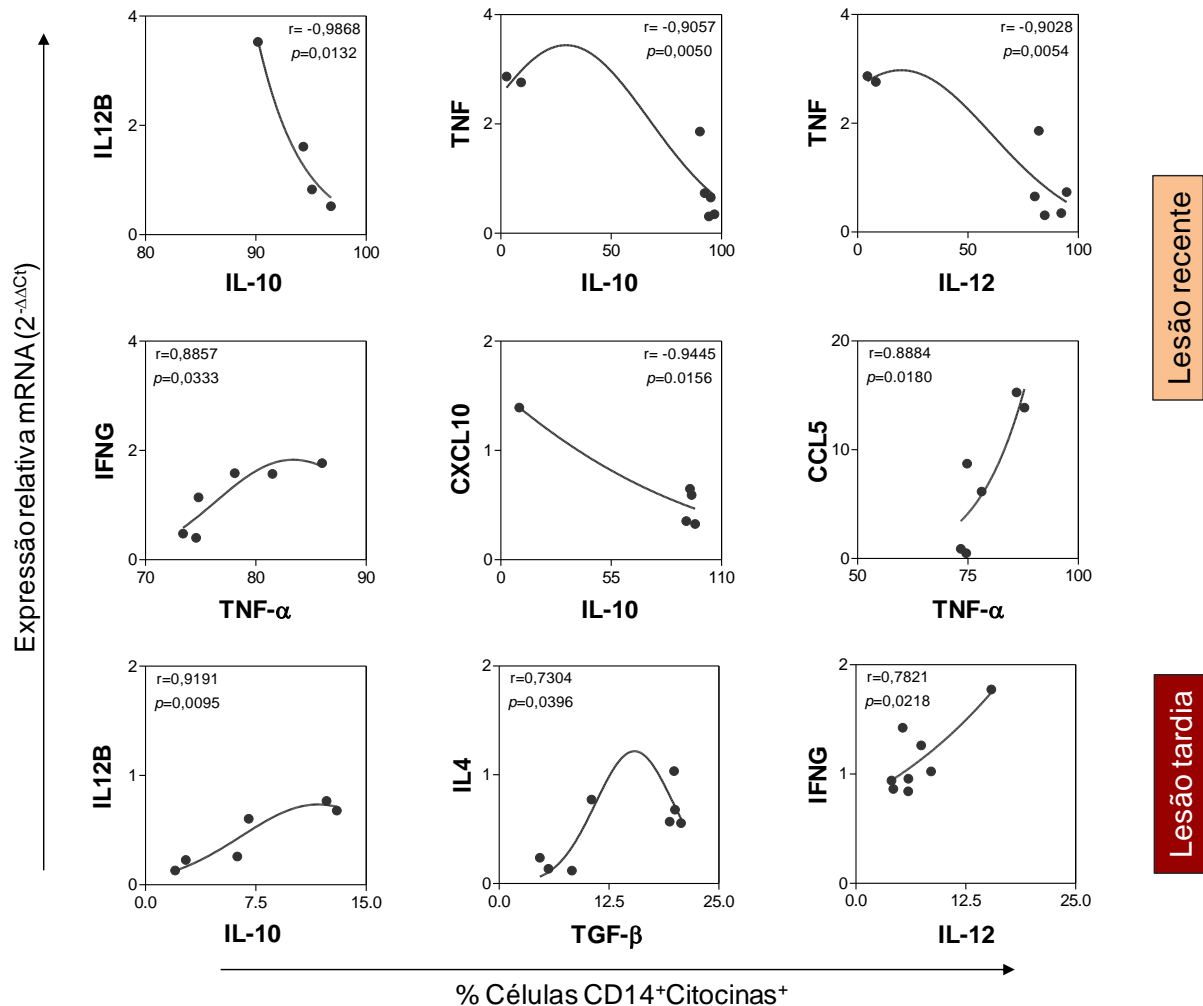
*5.2.7 Análise de correlação entre citocinas analisadas no sangue periférico e citocinas/quimiocinas expressas no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão*

*5.2.7.1 Monócitos circulantes X Infiltrado inflamatório*

A análise de correlação entre citocinas analisadas no sangue periférico e citocinas/quimiocinas expressas no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores

de LC demonstrou, no grupo lesão recente, que o IE de IL-10 sintetizada por monócitos circulantes correlacionou-se de forma negativa com os níveis de transcritos das citocinas IL12B ( $r = -0,9868$  e  $p = 0,0132$ ), TNF ( $r = -0,9057$  e  $p = 0,0050$ ) e quimiocina CXCL10 ( $r = -0,9445$  e  $p = 0,0156$ ) no infiltrado inflamatório (Figura 42). A análise dos dados mostrou também, no grupo lesão recente, que o IE de IL-12 sintetizada por monócitos circulantes correlacionou-se de forma negativa com os níveis de transcritos de TNF ( $r = -0,9028$  e  $p = 0,0054$ ) no infiltrado inflamatório (Figura 42). Por outro lado, observou-se, novamente no grupo lesão recente, correlação positiva entre o IE de TNF- $\alpha$  sintetizado por monócitos circulantes e os níveis de transcritos de IFNG ( $r = 0,8857$  e  $p = 0,0333$ ) e CCL5 ( $r = 0,8884$  e  $p = 0,0180$ ) no infiltrado inflamatório (Figura 42).

A análise de correlação demonstrou, no grupo lesão tardia, correlação positiva entre o IE das citocinas IL-10 e IL-12 sintetizadas por monócitos circulantes e os níveis de transcritos de IL12B ( $r = 0,9191$  e  $p = 0,0095$ ) e IFNG ( $r = 0,7821$  e  $p = 0,0218$ ), respectivamente, no infiltrado inflamatório. Além disso, observou-se também correlação positiva entre TGF- $\beta$  sintetizado por monócitos circulantes e IL4 ( $r = 0,7304$  e  $p = 0,0396$ ) tecidual (Figura 42).



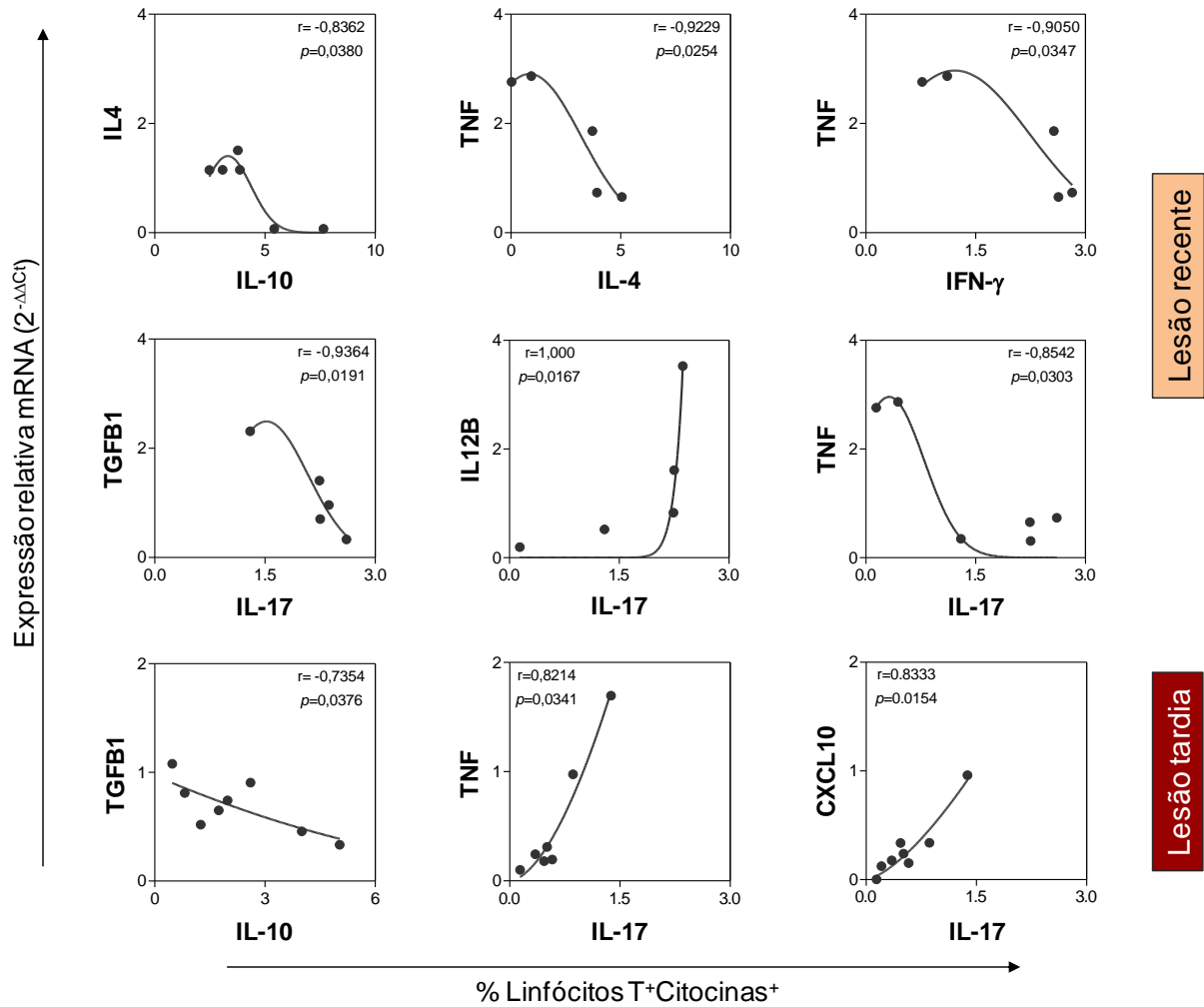
**Figura 42:** Correlações entre citocinas sintetizadas por monócitos circulantes e citocinas/quimiocinas expressas em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente: ≤ 3 meses e tardia: > 3 meses). Os resultados estão apresentados em formato de gráficos de dispersão com valores individuais. Índices de correlação de Spearman (*r*) estão apresentados nos gráficos e correlações estatisticamente significativas entre as citocinas avaliadas foram consideradas quando o valor de *p* < 0,05. Linhas conectivas representam correlações positiva e negativa. Os valores de “*r*” e “*p*” para cada correlação estão inseridos dentro dos gráficos.

### 5.2.7.2 Linfócitos T circulantes X Infiltrado inflamatório

A análise de correlação entre citocinas sintetizadas por linfócitos T circulantes e citocinas/quimiocinas expressas no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes portadores de LC demonstrou, no grupo lesão recente, correlação negativa entre o IE das citocinas IL-10, IL-4 e IFN-γ sintetizadas por linfócitos T circulantes e os níveis de transcritos de IL4 ( $r = -0,8362$  e  $p = 0,0380$ ), TNF ( $r = -0,9229$  e  $p = 0,0254$ ) e TNF ( $r = -0,9050$  e  $p = 0,0347$ ), respectivamente, no infiltrado inflamatório (Figura 43). Além disso, verificou-se também correlação negativa entre o IE de IL-17 sintetizada por linfócitos T circulantes e os níveis de

transcritos das citocinas TGFB1 ( $r = -0,9364$  e  $p = 0,0191$ ) e TNF ( $r = -0,8542$  e  $p = 0,0303$ ) no infiltrado inflamatório (Figura 43). Por outro lado, observou-se, também no grupo lesão recente, correlação positiva entre o IE de IL-17 sintetizada por linfócitos T circulantes e os níveis de transcritos de IL12B ( $r = 1,000$  e  $p = 0,0167$ ) no infiltrado inflamatório (Figura 43).

Por fim, a análise dos dados mostrou, no grupo lesão tardia, correlação negativa entre o IE de IL-10 sintetizada por linfócitos T circulantes e os níveis de transcritos de TGFB1 ( $r = -0,7354$  e  $p = 0,0167$ ) no infiltrado inflamatório (Figura 43). Por outro lado, observou-se correlação positiva entre o IE de IL-17 sintetizada por linfócitos T circulantes e os níveis de transcritos de TNF ( $r = 0,8214$  e  $p = 0,0341$ ) e CXCL10 ( $r = 0,8333$  e  $p = 0,0154$ ) no infiltrado inflamatório (Figura 43).



**Figura 43: Correlações entre citocinas sintetizadas por linfócitos T circulantes e citocinas/quimiocinas expressas em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente: ≤ 3 meses e tardia: > 3 meses).** Os resultados estão apresentados em formato de gráficos de dispersão com valores individuais. Índices de correlação de Spearman (*r*) estão apresentados nos gráficos e correlações estatisticamente significativas entre as citocinas e quimiocinas avaliadas foram consideradas quando o valor de *p* < 0,05. Linhas conectivas representam correlações positiva e negativa. Os valores de “*r*” e “*p*” para cada correlação estão inseridos dentro dos gráficos.



**5.3 TÓPICO III:**

*“Síntese dos resultados”*

*5.3.1 Alterações fenotípico-funcionais em monócitos circulantes que não fagocitaram (CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>-</sup>/Leish<sup>-</sup>) e fagocitaram (CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup>/Leish<sup>+</sup>) promastigotas de L. (V.) braziliensis da população avaliada*

A avaliação da capacidade fagocítica de monócitos do sangue periférico demonstrou que pacientes do grupo LC apresentaram menor percentual de células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup> em relação ao grupo TM<sup>+</sup>sL.

De forma geral, observou-se que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram perfil ativado (HLA-DR, CD23) com maior produção da citocina inflamatória IL-12 em relação ao grupo CT. Por outro lado, verificou-se que monócitos Leish<sup>-</sup> do grupo LC apresentaram perfil ativado (HLA-DR, MHC-I, CD23) com maior produção da citocina moduladora IL-10 em relação ao grupo CT. Em síntese os resultados mostraram que monócitos Leish<sup>+</sup> dos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram menor IMF de receptores (TLR-2, TLR-4) relacionados ao reconhecimento do parasito. Além disso, observou-se que monócitos Leish<sup>+</sup> do grupo LC apresentaram perfil ativado (HLA-DR, MHC-I) com maior e menor produção das citocinas inflamatória (TNF- $\alpha$ ) e moduladora (IL-10), respectivamente, quando comparado ao grupo CT.

A análise dos resultados mostrou também que monócitos Leish<sup>-</sup> e Leish<sup>+</sup> do grupo LC apresentaram perfil ativado (MHC-I) com maior percentual/IMF de moléculas de co-estimulação (CD80, CD86), bem como menor e maior produção das citocinas inflamatórias IL-12 e TNF- $\alpha$  respectivamente, quando comparado ao grupo TM<sup>+</sup>sL.

Por fim, verificou-se que monócitos Leish<sup>-</sup> dos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram menor percentual/IMF de receptores relacionados à fagocitose/reconhecimento do parasito, do complemento, moléculas de ativação e co-estimulação e maior síntese das citocinas IL-12, IL-10 e TGF- $\beta$  quando comparado a monócitos Leish<sup>+</sup> dos mesmos grupos.

Sangue periférico

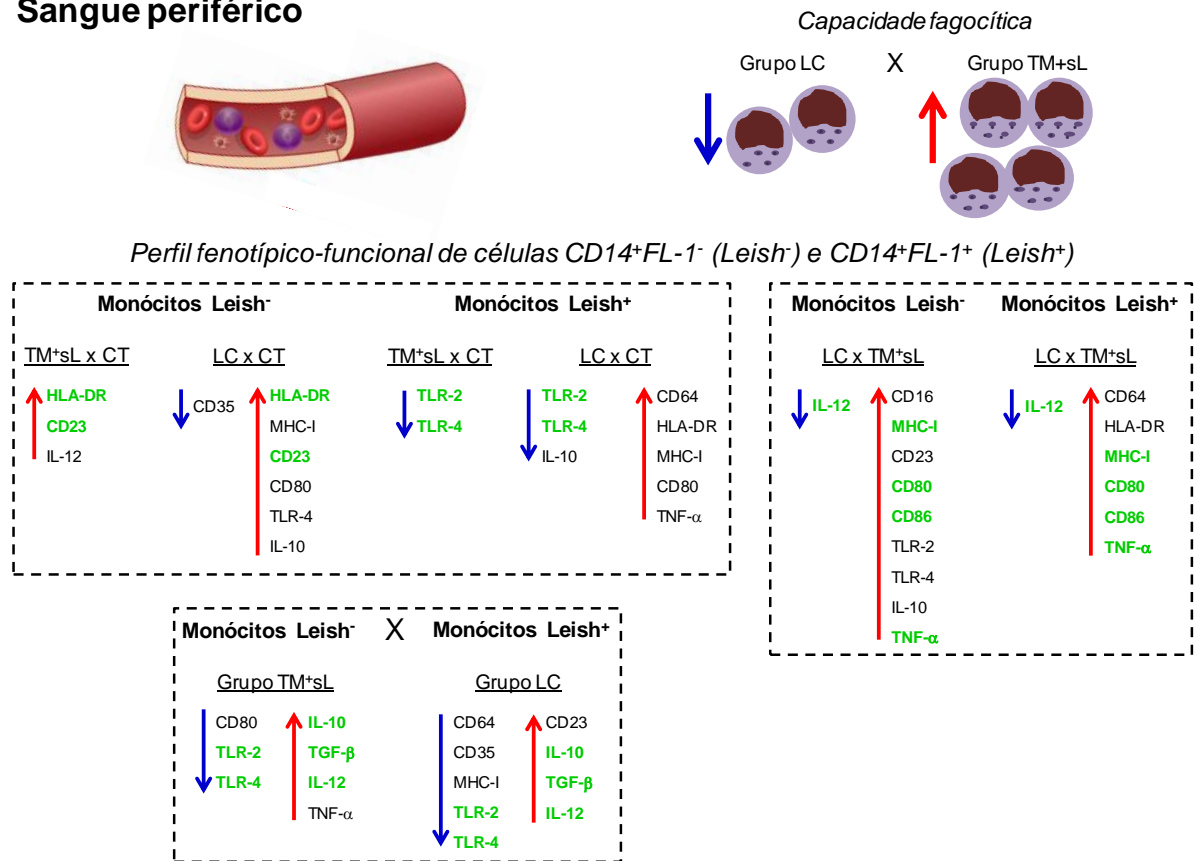


Figura 44: Síntese das alterações fenotípico-funcionais em monócitos circulantes da população avaliada que não fagocitaram (*Leish^-*) e fagocitaram (*Leish^+*) promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. As setas azuis e vermelhas representam menor ou maior, respectivamente, percentual/intensidade média de fluorescência dos marcadores e citocinas intracitoplasmáticas avaliados. As alterações comuns aos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC estão assinaladas em verde claro.

5.3.2 Alterações fenotípico-funcionais em monócitos e linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  circulantes da população avaliada, considerando a capacidade fagocítica relativa

Em síntese, os resultados mostraram que pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram menor IE de células  $CD14^+CD23^+$  juntamente com maior produção de IL-17, proveniente de linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , quando comparado ao grupo CT. Além disso, verificou-se que pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram menor IE de  $CD14^+CD23^+$  juntamente com menor produção de IFN-γ, proveniente de linfócitos T  $CD4^+$ , quando comparado ao grupo CT. De forma geral, observou-se que pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram perfil ativado ( $CD14^+MHC-I^+$ ) com maior IE de receptores relacionados à fagocitose e do complemento ( $CD14^+CD64^+$ ,  $CD14^+CD35^+$ ) e a molécula de co-estimulação  $CD14^+CD80^+$  com menor e maior produção das citocinas inflamatória ( $CD14^+TNF-α^+$ ) e moduladora

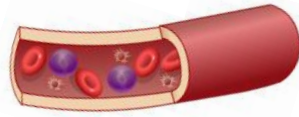
(CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>), respectivamente, quando comparado ao grupo CT. Além disso, verificou-se que pacientes com ↑ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram perfil ativado (CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) e maior IE de CD14<sup>+</sup>TLR-2<sup>+</sup> acompanhado pela maior produção da citocina moduladora (CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>).

A análise dos dados mostrou também que pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram menor produção das citocinas IFN-γ<sup>+</sup> e IL-17<sup>+</sup>, provenientes de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, em relação ao grupo TM<sup>+</sup>sL. Além disso, verificou-se que pacientes com ↑ capacidade fagocítica apresentaram menor IE de receptores relacionados à fagocitose e do complemento (CD64, CD35), bem como a molécula de co-estimulação CD80 quando comparado ao grupo TM<sup>+</sup>sL. Por outro lado, observou-se maior IE da molécula de ativação CD23 e receptores (TLR-2, TLR-4) relacionados a reconhecimento do parasito juntamente com maior produção de TNF-α e IL-10, provenientes de monócitos, quando comparado ao grupo TM<sup>+</sup>sL.

De forma geral, observou-se que pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram menor IE de receptores relacionados à fagocitose e do complemento, bem como da molécula de ativação MHC-I quando comparado ao mesmo grupo com ↑ capacidade fagocítica. Por outro lado, verificou-se maior IE de CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> juntamente com maior produção de IL-17, proveniente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e de citocinas moduladoras (CD14<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>). Os resultados mostraram também que pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram menor produção de IFN-γ, proveniente de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, em relação ao mesmo grupo com ↑ capacidade fagocítica. Por outro lado, observou-se maior IE da molécula de ativação CD80 e do receptor de reconhecimento do parasito TLR-2, bem como de citocinas moduladoras (CD14<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup>).

Por fim, verificou-se também que pacientes do grupo LC apresentaram, na cultura estimulada por Ag-Leish, menor IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> em relação aos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL.

Sangue periférico



Perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

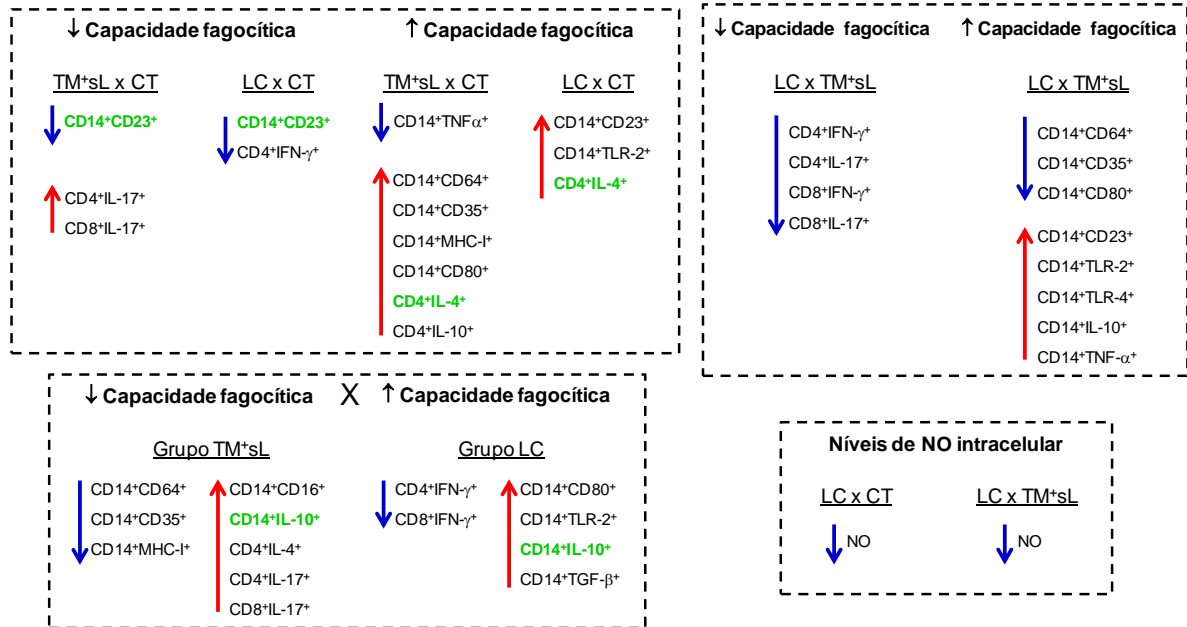
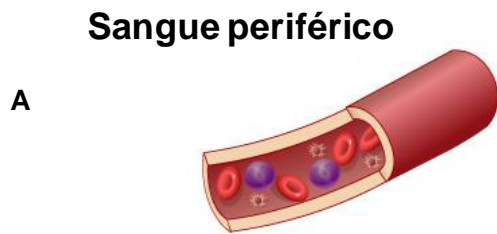


Figura 45: Síntese das alterações fenotípico-funcionais em monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes da população avaliada, considerando a capacidade fagocítica relativa. As setas azuis e vermelhas representam menor ou maior, respectivamente, percentual/intensidade média de fluorescência dos marcadores, citocinas e óxido nítrico intracitoplásmático avaliados. As alterações comuns aos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC estão assinaladas em verde claro.

5.3.3 Alterações fenotípico-funcionais no sangue periférico e perfil de expressão gênica no infiltrado inflamatório da lesão de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, de acordo com o tempo de evolução da lesão

Em síntese, os resultados mostraram, no sangue periférico, que pacientes do grupo lesão recente apresentaram menor IE da molécula de ativação CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> e co-estimulação CD14<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>, bem como de citocinas inflamatórias (CD14<sup>+</sup>TNF-α<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) e moduladoras (CD14<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>), quando comparado ao grupo lesão tardia. Por outro lado, observou-se maior capacidade em internalizar promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (células CD14<sup>+</sup>FL-1<sup>+</sup>), maior IE de receptores relacionados à fagocitose/reconhecimento do parasito (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>TLR-2<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>TLR-4<sup>+</sup>), bem como maior IE de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> (Figura 46A).

De forma geral, a análise do infiltrado inflamatório da lesão mostrou que pacientes do grupo lesão recente apresentaram maiores níveis de transcritos de citocinas e quimiocinas tanto inflamatórias (IL12B, IFNG, TNF, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10), quanto moduladoras (IL10, TGFB1, IL4) , bem como maior carga parasitária em relação ao grupo lesão recente (Figura 46B).



Perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

Lesão recente	X	Lesão tardia
CD14 <sup>+</sup> CD23		Fagocitose
CD14 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup>		CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>
CD14 <sup>+</sup> IL-10		CD14 <sup>+</sup> TLR-2 <sup>+</sup>
CD14 <sup>+</sup> TGF-β <sup>+</sup>		CD14 <sup>+</sup> TLR-4 <sup>+</sup>
CD14 <sup>+</sup> TNF-α <sup>+</sup>		NO
CD4 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup>		
CD4 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup>		
CD8 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup>		
CD8 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup>		

**Foco inflamatório da lesão**

Perfil de expressão gênica e carga parasitária em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea

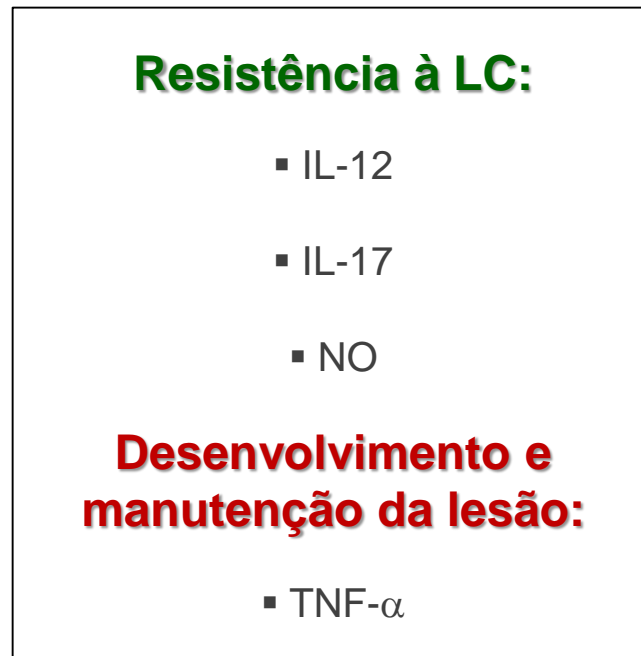


Lesão recente	X	Lesão tardia
IL10		CCL2
TGFB1		CCL3
IL4		CCL5
IL12B		CXCL10
IFNG		Carga parasitária
TNF		

**Figura 46:** Síntese das alterações fenotípico-funcionais no sangue periférico (A) e perfil de expressão gênica em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC) (B), de acordo com o tempo de evolução da lesão (recente: ≤ 3 meses e tardia: > 3 meses). Na Figura A, as setas azuis e vermelhas representam menor ou maior, respectivamente, IE dos marcadores, citocinas e óxido nítrico intracitoplásmico avaliados. Na Figura B, a seta vermelha representa maiores níveis de transcritos das citocinas avaliadas e carga parasitária.

5.3.4 Proposição de biomarcadores associados à resistência à LC e ao desenvolvimento e manutenção da lesão

Por fim, a análise dos resultados obtidos no presente estudo permitiu a identificação e proposição de potenciais biomarcadores associados à resistência à LC (IL-12, IL-17 e NO) e ao desenvolvimento e manutenção da lesão (TNF-α) (Figura 47).



**Figura 47: Biomarcadores associados à resistência à leishmaniose cutânea (LC) e ao desenvolvimento e manutenção da lesão.** As citocinas inflamatórias IL-12 e IL-17 e a produção de óxido nítrico estariam associadas à resistência à leishmaniose cutânea (LC) e a citocina TNF- $\alpha$  estaria associada ao desenvolvimento e manutenção da lesão.





Com o intuito de melhor compreender os mecanismos imunológicos envolvidos no estabelecimento/manutenção e resistência à infecção pela *L. (V.) braziliensis*, o presente estudo caracterizou a resposta imune de indígenas da comunidade Xakriabá com TM positivo na ausência de lesões ou cicatrizes (grupo TM<sup>+</sup>sL) e portadores de leishmaniose cutânea (grupo LC) por meio da avaliação da capacidade fagocítica e perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T do sangue periférico (receptores Fc $\gamma$ , do complemento e TLRs e moléculas de ativação e co-estimulação, produção de citocinas e óxido nítrico intracelulares), após interação com promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*. Além disso, a resposta imune localizada também foi caracterizada por meio de avaliação histopatológica, quantificação da carga parasitária e análise de citocinas e quimiocinas por RT-qPCR no infiltrado inflamatório das lesões dos pacientes do grupo LC.

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório que necessita ser rapidamente internalizado por células do hospedeiro para que possa sobreviver e replicar (Sacks & Sher 2002, Cummings, Tuladhar, Satoskar 2010). O parasito é, preferencialmente, fagocitado por células dendríticas e macrófagos (Teixeira et al. 2006), e mais recentemente foi demonstrado que neutrófilos têm papel fundamental no processo de fagocitose (Peters et al. 2008, John & Hunter 2008). Os macrófagos são hospedeiros definitivos para a *Leishmania* e desempenham funções efetoras cruciais na eliminação do parasito e resolução da doença (Teixeira et al. 2006, Cummings, Tuladhar & Satoskar 2010). No entanto, esse processo de resolução não é tão simples e diversos fatores têm sido associados à evolução da infecção: 1) A *Leishmania* consegue evadir da resposta imune do hospedeiro (de Souza-Leao et al. 1995, Belkaid, Butcher & Sacks 1998, von Stebut 2007, Laskay, van Zandbergen, Solbach 2008); 2) Polimorfismos que afetam a expressão e função de determinadas citocinas podem levar a maior gravidade da doença (Cabrera et al. 1995, Castellucci et al. 2006, Ramasawmy et al. 2010); 3) A *Leishmania* ativa um repressor transcricional (p50/p50) do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), levando à redução da expressão da enzima iNOS (Calegari-Silva et al. 2009).

No presente estudo, a análise dos resultados demonstrou que pacientes do grupo LC apresentaram menor capacidade fagocítica em relação aos grupos TM<sup>+</sup>sL e CT. A entrada da *Leishmania* em macrófagos é mediada pela interação do parasito com diversos receptores presentes na superfície dessas células (Singh et al. 2012). Sendo assim, já foi demonstrado que a internalização de formas promastigotas pode ser promovida por receptores de fibronectina (Brittingham et al. 1999) e manose-fucose (Wilson & Pearson 1986, 1988), bem como receptores do complemento (CR) CR1 (da Silva et al. 1989) e CR3 (Mosser & Edelson

1985) que tem a interação facilitada pela opsonização com o componente do complemento C3bi (Johnson & Hetland 1988, Mosser & Edelson 1984, Mosser, Springer & Diamond 1992). Esses dois últimos são os principais receptores envolvidos na internalização do parasito (Domínguez et. al 2003, von Stebut 2007). Sendo assim, a ativação do complemento, quando não resulta em lise do parasito (Mosser & Brittingham 1997), leva à opsonização da *Leishmania* por C3b1, permitindo que a fagocitose, via CR, ocorra de forma “silenciosa” (Mosser & Edelson 1985, von Stebut 2007). A avaliação do receptor do complemento CD35-CR1, no presente estudo, mostrou que monócitos que não fagocitaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* do grupo LC apresentaram menor IMF dessa molécula em relação a monócitos que fagocitaram, sugerindo que essa alteração poderia estar associada a menor capacidade fagocítica observada no grupo LC.

Além disso, os receptores CR3 e Fc (FcR) (Guy & Belosevic 1993) podem promover também a fagocitose de formas amastigotas, sendo que no caso do último, a interação é facilitada pela opsonização com a imunoglobulina G (IgG) (Morehead, Coppens & Andrews 2002). De fato, alguns receptores Fc $\gamma$  estão mais associados à internalização de formas amastigotas (Wetzel, McMahon-Pratt & Koleske 2012) e diversos estudos observaram que a internalização dessas formas, opsonizadas por IgG, via Fc $\gamma$  RIII (CD16) e RI (CD64) sustentam à infecção em modelos murinos com LC (Kima et al. 2000, Colmenares et al. 2002, Woelbing et al. 2006). Alguns estudos têm associado à fagocitose mediada por receptores Fc $\gamma$  a um maior dano tecidual (Peters et al. 1995, Kima et al. 2000). Outros mostraram que a interação com esses receptores pode levar a menor produção de IL-12 por macrófagos (Sutterwala et al. 1997). IL-12 é a principal citocina indutora fisiológica de IFN- $\gamma$  e diferenciação da resposta *Tipo 1*, sendo essencial para o combate de patógenos intracelulares como a *Leishmania* (Reiner et al. 1994, Carrera et al. 1996, Belkaid et al. 1998, McDowell & Sacks 1999). Na abordagem metodológica do presente estudo utilizou-se formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, no entanto, alterações importantes foram observadas na avaliação dos receptores Fc $\gamma$ . Monócitos que fagocitaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* do grupo LC apresentaram maior IMF de CD64-Fc $\gamma$  RI e menor produção de IL-12 quando comparado ao grupo TM<sup>+</sup>sL. Segundo Kima et al. (2000), embora a internalização de formas promastigotas, via FcR, não ocorra comumente em estágios iniciais da infecção, essas formas transformam-se rapidamente em amastigotas após fagocitose por macrófagos; e ainda, mesmo que não ocorra internalização, é provável que aconteça interação promastigotas-FcR, o que poderia explicar às alterações observadas. Além disso, observou-se também que monócitos que não fagocitaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* do

grupo LC apresentaram maior percentual de CD16-Fc $\gamma$  RIII juntamente com menor produção de IL-12. Nesse contexto, alguns estudos têm demonstrado que as subclasses de IgG, predominantemente, detectadas na LC (IgG1 e IgG3) (de Souza et al. 2005, Ozbilge et al. 2006) ligam-se preferencialmente ao CD16, indicando que esse receptor desempenha papel crítico na doença (Thomas et al. 2008). Em outro estudo, Soares et al. (2006) demonstraram maior expressão de CD16 em monócitos de pacientes portadores de LC, sugerindo que esse receptor poderia ter efeitos deletérios na leishmaniose humana. Sendo assim, parece que a *Leishmania* promove alterações em todo microambiente da infecção, favorecendo a progressão da doença e desenvolvimento das lesões.

Os momentos iniciais da interação *Leishmania*-hospedeiro são cruciais para o resultado da infecção. Nesse contexto, existem evidências que o fenótipo da leishmaniose pode ser determinado nas primeiras horas da infecção, iniciando com o reconhecimento de PAMPs do parasito por PRRs presente na superfície das células do hospedeiro, com destaque para os TLRs (Launois et al. 1995, Sacks & Noben-Trauth 2002). Após o reconhecimento de antígenos específicos do parasito, os TLRs ativam, via molécula adaptadora MyD88 (exceto TLR-3), os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B, ativador de proteína-1 (AP-1) e fator regulador de interferon (IRFs) que promovem a síntese de várias citocinas inflamatórias (Beutler et al. 2006, O'Neill and Bowie 2007, Tuon et al. 2008, Singh et al. 2012, Faria et al. 2012). De acordo com alguns estudos, o reconhecimento do lipofosfoglicano (LPG) de *L. major*, via TLR-2, pode levar à ativação de NF- $\kappa$ B e produção de TNF- $\alpha$  (Veer et al. 2003), IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-10, bem como espécies reativas de oxigênio (Kavoosi, Ardestani & Kariminia 2009). Recentemente, Ibraim et al. (2013) mostraram que LPG de espécies diferentes podem induzir perfil imunológico distinto. Nesse contexto, os autores constataram que macrófagos estimulados com LPG de *L. (V.) braziliensis* produzem mais TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NO quando comparado ao LPG de *L. (L.) infantum (chagasi)*. E nesse caso, o reconhecimento via TLR-4 foi mais importante que TLR-2. Em outro estudo, Flandin et al. (2006) observaram que TLR-2 e TLR-3 estão envolvidos na fagocitose de formas promastigotas de *L. donovani* e síntese de TNF- $\alpha$  e NO. Chandra & Naik (2008) demonstraram que a supressão de TLR-2 resulta em redução da produção de IL-12 e aumento de IL-10, levando à progressão da doença. Por outro lado, Guerra et al. (2010) mostraram que camundongos deficientes para TLR-2 apresentaram redução da carga parasitária e do recrutamento de células inflamatórias durante os estágios iniciais da infecção por *L. (L.) amazonensis*. Tuon et al. (2012) observaram que lesões de pacientes com LC causada por *L. (V.) braziliensis* apresentam maior número de macrófagos expressando TLR-2 que TLR-4, entretanto, sem correlação com

produção de citocinas ou outras células presentes no foco inflamatório (células NK e dendríticas). Outros autores mostraram que o controle do crescimento parasitário correlacionou-se com indução de iNOS, provavelmente via TLR-4. Na ausência desse receptor, os autores observaram que a sobrevivência da *L. major* foi maior e diretamente associada ao aumento da atividade da enzima arginase que pode ser promovido pelas citocinas IL-4 e IL-10 (Kropf et al. 2004a). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) em TLRs podem levar a maior susceptibilidade às doenças infecciosas (Lorenz et al. 2002, Agnese et al. 2002, Mockenhaupt et al. 2006). Dois polimorfismos têm sido descritos para TLR-4: *Asp299Gly*, *Thr399Ile*, que estão localizados no domínio extracelular da molécula (Arbour et al. 2000). Ajdary et al. (2011) verificaram que a frequência de ambos genótipos foi maior em pacientes com LC crônica (refratária ao tratamento) quando comparado a pacientes com lesões mais recentes e assintomáticos (TM positivo sem lesão), sugerindo que essas mutações poderiam contribuir para uma doença mais grave. No presente estudo, a internalização da *L. (V.) braziliensis* promoveu alterações nos dois TLRs avaliados (TLR-2 e TLR-4), levando à menor IMF desses receptores em monócitos que fagocitaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* dos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC em relação ao grupo controle. Além disso, no grupo LC, a redução de TLR-2 e TLR-4 foi acompanhada pela maior IMF/percentual de moléculas de ativação (MHC-I e HLA-DR), co-estimulação (CD80), menor produção de IL-10 e maior de TNF- $\alpha$ . Contudo, essa aparente redução dos TLRs avaliados poderia indicar maior interação do parasito com as células hospedeiras, via TLR-2 e TLR-4. Ainda foi possível observar que ambos parecem estar associados indiretamente ao processo de fagocitose do parasito, uma vez que monócitos que não fagocitaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* dos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram menor IMF desses dois receptores em relação a monócitos que fagocitaram.

Na leishmaniose, diversas células podem contribuir para produção de IL-10, incluindo células dendríticas, macrófagos e células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) (Campanelli et al. 2006, Carvalho et al. 2012). No presente estudo, de forma interessante, observou-se que monócitos que não internalizaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* do grupo LC apresentaram perfil ativado, caracterizado por MHC-I, HLA-DR, CD23, CD80 e TLR-4, e sintetizaram maior quantidade de IL-10. Por outro lado, monócitos que não fagocitaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram perfil ativado, porém com maior produção da citocina IL-12, que está diretamente associada à eliminação da *Leishmania* (Reiner et al. 1994, Carrera et al. 1996, Belkaid et al. 1998, McDowell & Sacks

1999). De acordo com alguns autores, macrófagos alto produtores de IL-10 e com síntese reduzida de IL-12 têm sido descritos como reguladores ou indutores de resposta *Tipo 2* (Gerber & Mosser 2001, Anderson & Mosser 2002, Mosser 2003, Mosser & Zhang 2008). Eles diferem daqueles classicamente ativados (induzidos por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  via TLRs) (Nathan 1991, Mosser 2003, Mosser & Zhang 2008) ou ativados alternativamente (induzidos por IL-4) (Stein et al. 1992, Gordon 2003, Mosser & Zhang 2008) e podem ser induzidos por dois sinais: 1) Imunocomplexos, via receptores Fc $\gamma$ ; 2) Ativação de TLRs (Anderson & Mosser 2002, Mosser 2003, Mosser & Zhang 2008). Além disso, alguns autores observaram que os macrófagos reguladores apresentam alta expressão de HLA-DR, CD80, CD86 e síntese de CCL1, bem como acentuada atividade anti-inflamatória (Mosser 2003, Mosser & Zhang 2008, Fleming & Mosser 2011). Diante do exposto é possível hipotetizar que monócitos que não fagocitaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* do grupo LC estariam atuando como reguladores ou indutores de resposta *Tipo 2*, favorecendo o crescimento do parasito e progressão da doença.

Enquanto na LV o papel da IL-10 tem sido bem estabelecido, modulando a resposta *Tipo 1* com redução da proliferação linfocitária e da produção de IFN- $\gamma$  (Carvalho et al. 1994a, Nysten & Sacks 2007), a função dessa citocina na patogênese da LC necessita ser melhor elucidada. Evidências apontam que IL-10 favorece o crescimento parasitário na fase inicial da doença, contribuindo para o estabelecimento e manutenção da infecção (Chatelain, Mauze & Coffman 1999, Salhi et al. 2008, Castellano et al. 2009, Carvalho et al. 2012), entretanto esse mecanismo ainda não é bem compreendido. Segundo de-Campos et al. (2010), a IL-10 poderia desativar células apresentadoras de antígenos infectadas que deixariam de responder à estimulação por IFN- $\gamma$ . Contudo, em outro modelo de resposta inflamatória cutânea e não associado à LC, Berg et al. (1995) observaram que IL-10 previne a resposta imune exacerbada, reduzindo o dano tecidual. De fato, essa citocina parece ter papel semelhante na LC, onde foi demonstrado que células T reguladoras, produtoras de grande quantidade de IL-10, podem contribuir para redução do dano tecidual e da carga parasitária nas lesões (Ji et al. 2005). Bourreau et al. (2001) demonstraram que, durante a fase inicial da infecção pela *L. guyanensis*, pacientes com alta expressão intralésional de IL-10 apresentaram resposta ineficiente ao tratamento com isotionato de pentamidina. Os autores acreditam que a IL-10 poderia prejudicar a resposta ao tratamento por inibir a produção de citocinas do *Tipo 1* (IL-12, IFN- $\gamma$ ) e/ou a maturação de células dendríticas que são essenciais para resposta imune efetiva. Diferentemente, Anderson, Mendez & Sacks (2005) mostraram que a ausência de IL-10 levou à eliminação do parasito e cura clínica de camundongos infectados por uma cepa

extremamente virulenta de *L. major*. No entanto, a eliminação do parasito, na falta de IL-10, tem sido associada à perda de imunidade na reinfecção. Dessa forma, parece que essa citocina está envolvida em ambos processos, progressão da doença quando produzida em níveis mais altos e desenvolvimento de células T de memória quando a produção é mais baixa (Belkaid et al. 2002).

A citocina TNF- $\alpha$  é, predominantemente, produzida por macrófagos e tem papel fundamental na defesa contra patógenos intracelulares (Bazzoni & Beutler 1996, Körner & Sedgwick 1996, Körner et al. 2010). Na LC tem sido demonstrado que, juntamente com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  promove produção de NO, via indução de iNOS, e consequente destruição da *Leishmania* (Green et al. 1990, Stenger et al. 1994, Qadoumi et al. 2002, Díaz et al. 2003, Horta et al. 2012). No entanto, Giudice et al. (2012) mostraram que macrófagos, infectados por *L. (V.) braziliensis*, de pacientes com LC e LM produziram maior quantidade de TNF- $\alpha$  em relação a macrófagos de pacientes assintomáticos ou subclínicos, que por outro lado, apresentaram maior capacidade leishmanicida. De fato, por sua elevada capacidade inflamatória, alguns estudos têm mostrado que níveis mais altos de TNF- $\alpha$  estão associados a maior dano tecidual (Antonelli et al. 2005, Oliveira et al. 2011) ou desenvolvimento de uma forma mais grave da doença (Cabrera et al. 1995, Bacellar et al. 2002). O mecanismo pelo qual pacientes com LC ou LM sintetizam níveis elevados de TNF- $\alpha$  ainda não foi bem estabelecido. Fatores genéticos do hospedeiro (polimorfismos em TNF- $\alpha$ ) ou associados ao parasito (*Leishmania* infectada por vírus de RNA) poderiam estar envolvidos nesse fenômeno (Cabrera et al. 1995, Ives et al. 2011, Hartley et al. 2012, Zangger et al. 2013). No presente estudo, apesar da produção considerável de TNF- $\alpha$  por monócitos que não fagocitaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* do grupo TM<sup>+</sup>sL, verificou-se que a síntese dessa citocina pelas mesmas células do grupo LC foi significativamente maior. Além disso, monócitos que fagocitaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* do grupo LC também produziram mais TNF- $\alpha$  que a mesma população celular dos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL. E de forma interessante, todas as citocinas avaliadas foram sintetizadas em menores níveis por monócitos que fagocitaram formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, com exceção de TNF- $\alpha$ , que foi produzido de forma acentuada, e essa alteração foi observada somente no grupo LC. Apesar dessa elevada produção de TNF- $\alpha$  por monócitos de pacientes do grupo LC, verificou-se que esses pacientes produziram menos NO, após estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania*, em relação aos pacientes dos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL. E nenhuma correlação positiva foi observada entre os níveis de TNF- $\alpha$  e NO nos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC (dados não mostrados).

Dessa forma, é possível hipotetizar que se realmente o TNF- $\alpha$  estiver envolvido no controle da LC, provavelmente não seria via produção de NO, que poderia estar sendo induzido por outras citocinas como, IL-12 e IFN- $\gamma$ . Contudo, parece que o TNF- $\alpha$  estaria muito mais associado ao desenvolvimento das lesões do que controle da doença.

Com o intuito de verificar se pacientes que internalizaram menos formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* diferem daqueles com maior capacidade fagocítica, criou-se um índice denominado “Capacidade fagocítica relativa”. Através desse índice foi possível segregar a população avaliada em duas categorias: 1)  $\downarrow$  capacidade fagocítica; 2)  $\uparrow$  capacidade fagocítica. Sendo assim, a avaliação do perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> mostrou que pacientes com  $\downarrow$  capacidade fagocítica dos grupos TM<sup>+</sup>sL e LC apresentaram redução do IE da molécula de ativação CD23. Por outro lado, observou-se que pacientes com  $\uparrow$  capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram maior IE dessa molécula, juntamente com maior produção de IL-4 e TNF- $\alpha$  quando comparado aos grupos CT e TM<sup>+</sup>sL, respectivamente. CD23 é um receptor de baixa-afinidade para IgE (Fce RII) expresso em monócitos/macrófagos ativados (Delespesse et al. 1991, Vouldoukis et al. 1994). De acordo com alguns autores, a interação via CD23 leva à produção de diversas citocinas como, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1, assim como espécies reativas do oxigênio (Dugas et al. 1995, Mossalayi, Arock & Debré 1997). Vouldoukis et al. (1994) demonstraram que pacientes com LC causada por *L. (V.) braziliensis* apresentaram altos níveis séricos de IgE e TNF- $\alpha$  que correlacionaram com a expressão de CD23, IL-4 e TNF- $\alpha$  nas lesões. Após quimioterapia específica, essas alterações não foram observadas, porém persistiram em pacientes refratários ao tratamento. Por outro lado, Baratta-Masini (2006) demonstrou que pacientes com TM positivo e sem lesão apresentaram maior expressão de CD23 e síntese de IL-4, juntamente com altos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato. Em outro estudo, Vouldoukis et al. (1995) mostraram que a interação via CD23, na presença de IL-4 e IFN- $\gamma$ , levou à síntese de NO e morte da *Leishmania*. Além disso, os autores observaram que a associação TNF- $\alpha$  mais IFN- $\gamma$ , aumentou de forma significativa a capacidade leishmanicida dos macrófagos, no entanto, quando o TNF- $\alpha$  foi analisado isoladamente não produziu nenhum efeito. Contudo, no presente estudo apesar do maior IE de CD23 e produção de IL-4 por pacientes com  $\uparrow$  capacidade fagocítica do grupo LC, não se observou nenhuma correlação entre esses marcadores e a síntese de NO (dados não mostrados). Por outro lado e de forma surpreendente, verificou-se que a produção de TNF- $\alpha$  correlacionou-se de forma negativa com os níveis de NO. Novamente, esses achados dão suporte à hipótese levantada

anteriormente sobre o papel do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento das lesões. Estudos futuros serão realizados com o objetivo de verificar se o diâmetro da lesão estaria associado aos níveis de TNF- $\alpha$  observados.

Enquanto pacientes com  $\downarrow$  capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL produziram mais IL-17 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, pacientes do grupo LC produziram menos IFN- $\gamma$ , citocina que promove ativação de macrófagos e tem papel fundamental na eliminação da *Leishmania* (Green et al. 1990, Stenger et al. 1994, Lykens et al. 2010, Carvalho et al. 2012, Horta et al. 2012). De fato, parece que essas duas citocinas tem função importante na resistência à doença, visto que linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de pacientes com  $\downarrow$  capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL produziram maior quantidade de IFN- $\gamma$  e IL-17 quando comparado ao grupo LC. Nesse contexto, alguns autores já demonstraram que o controle da infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6 correlaciona-se com a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e a ausência dessa citocina tem sido associada à progressão da doença (Scott et al. 1989, Reiner & Locksley 1995, Kima & Song 2013). Em outro estudo, Lykens et al. (2010) mostraram que camundongos com macrófagos que não respondem ao IFN- $\gamma$  foram incapazes de produzir NO e controlar a infecção por *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *L. major*, após estímulo por essa citocina. Além disso, os autores observaram que esses camundongos apresentaram alta taxa de mortalidade. Mais recentemente, outra citocina inflamatória (IL-17) tem sido amplamente estudada na leishmaniose, no entanto, seu papel ainda permanece controverso. Enquanto alguns autores têm mostrado que a IL-17 estaria associada à progressão da doença ou maior dano tecidual (Bacellar et al. 2009, Kostka et al. 2009, Boaventura et al. 2010), outros mostraram que essa citocina poderia contribuir para auto-resolução das lesões ou proteção e resistência à leishmaniose (Vargas-Inchaustegui et al. 2008, Pitta et al. 2009, Novoa et al. 2011).

A IL-17 estimula a produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), de fatores estimuladores de colônias (GM-CSF e G-CSF), bem como síntese das quimiocinas CXCL1, CXCL8, CXCL10 que atuam como quimioatraentes para neutrófilos e células do *Tipo 1* (Ouyang1, Kolls & Zheng 2008, Korn et al. 2009). A resposta *Tipo 1* é essencial para o controle da infecção por *Leishmania*, entretanto o desenvolvimento de uma resposta inflamatória “*desregulada*” tem sido associado à patogênese das lesões (Scott et al. 1988, Bacellar et al. 2002, Faria et al. 2005, Carvalho et al. 2007, Brelaz et al. 2012). Por outro lado, os mecanismos que levariam à eliminação do parasito sem causar dano tecidual ainda são pouco compreendidos (Gomes-Silva et al. 2007). Alguns autores sugeriram que a resistência à



infecção pela *Leishmania* poderia estar associada ao combate imediato do parasito através de uma resposta imune balanceada, envolvendo citocinas inflamatórias *Tipo 1 e 17* (IFN- $\gamma$ , IL-17) e moduladoras (IL-10, IL-4) (Baratta-Masini et al. 2007, Pitta et al. 2009, Novoa et al. 2011, Giudice et al. 2012). De fato, mecanismos moduladores são fundamentais para prevenção ou redução do dano tecidual. Recentemente e de forma surpreendente, Gonzalez-Lombana et al. (2013) demonstraram que na ausência da citocina moduladora IL-10, o IFN- $\gamma$  foi capaz de regular a produção da citocina IL-17, reduzindo drasticamente o dano tecidual. Nesse contexto, observou-se que pacientes do grupo TM<sup>+</sup>sL, além da produção de citocinas inflamatórias, sintetizaram também citocinas moduladoras (IL-10, IL-4) e altos níveis de NO, indicando que esse perfil de resposta imune balanceada e efetora poderia combater a infecção sem provocar dano tecidual. Esse equilíbrio entre resposta inflamatória e modulada foi mais evidente em pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo TM<sup>+</sup>sL (maior produção de IL-10, IL-4 e IL-17) em relação ao mesmo grupo com ↑ capacidade fagocítica que, por outro lado, apresentou maior IMF de receptores relacionados à fagocitose do parasito (CD64, CD35) (da Silva et al. 1989, Guy & Belosevic 1993, Domínguez et al. 2003, von Stebut 2007) e da molécula de ativação MHC-I em monócitos do sangue periférico.

No grupo LC, verificou-se perfil ativado (CD23, TLR-2, TLR-4) juntamente com produção de citocinas moduladoras (IL-10, IL-4) e inflamatória (TNF- $\alpha$ ). Contudo, esse perfil “*aparentemente*” balanceado não foi capaz de controlar a infecção e impedir o desenvolvimento das lesões. De acordo com alguns autores, pacientes com LM produzem menos IL-10 ou apresentam redução da expressão do receptor (IL-10R) dessa citocina (Bacellar et al. 2002, Faria et al. 2005, Gaze et al. 2006, Gomes-Silva et al. 2007). Diante do exposto, é possível sugerir que uma produção insuficiente de citocinas moduladoras e/ou deficiência nos receptores dessas moléculas poderia estar ocorrendo no grupo LC, contribuindo para imunopatologia da doença. Além disso, observou-se que pacientes com ↓ capacidade fagocítica do grupo LC apresentaram perfil mais modulado que pacientes do mesmo grupo com ↑ capacidade fagocítica. Esse perfil foi caracterizado por menor produção de IFN- $\gamma$  e maior de IL-10 e TGF- $\beta$  que poderia favorecer o crescimento da *L. (V.) braziliensis*.

Diversos estudos já demonstraram a influência do tempo de evolução da lesão no perfil imunológico de pacientes com LC (Melby et al. 1994, Rocha et al. 1999, Baratta-Masini et al. 2007, Campanelli et al. 2010, Freitas-Teixeira et al. 2012, Hejazi et al. 2012). No entanto, esse é o primeiro estudo que avaliou mecanismos imunológicos envolvidos no estabelecimento e manutenção da infecção pela *L. (V.) braziliensis* em indígenas que, na

maioria das vezes, apresentam hábitos e costumes culturais diferenciados de populações não-indígenas, bem como residem em comunidades onde o contato é restrito. Além disso, os autores têm utilizado diferentes períodos para definir lesões recentes e tardias, o que poderia dificultar a comparação dos resultados.

No presente estudo, os pacientes do grupo LC foram categorizados, de acordo com o tempo de evolução da lesão, em dois grupos: Lesão recente (lesões  $\leq 3$  meses de evolução) e Lesão tardia (lesões  $> 3$  meses de evolução). Essa categorização foi baseada em uma análise por heat map que mostrou forte associação entre o tempo de evolução da lesão e o perfil de expressão gênica de citocinas e quimiocinas. De acordo com essa análise, observou-se que pacientes com lesões  $\leq 3$  meses de evolução apresentaram perfil de expressão gênica distinto daqueles com lesões  $> 3$  meses de evolução, permitindo segregá-los em dois grupos distintos, de acordo com os parâmetros avaliados. Além disso, análises preditivas utilizando períodos inferiores a 3 meses (*lesões recentes*:  $\leq 1$  ou  $\leq 2$  meses de evolução e *lesões tardias*:  $> 1$  ou 2 meses de evolução) foram realizadas (dados não mostrados) e a análise por heat map mostrou que nessas condições a associação entre o tempo de evolução da lesão e o perfil imunológico foi semelhante àquela observada para 3 meses (*recente*:  $\leq 3$  meses e *tardia*:  $> 3$  meses), sugerindo que este período seria apropriado para classificação das lesões em recentes e tardias. Por outro lado, a análise por heat map mostrou que não houve associação entre o número e tipo de lesões e o perfil de expressão gênica observado. Sendo assim, os resultados das avaliações realizadas no sangue periférico (perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e no infiltrado inflamatório das lesões (histopatologia, quantificação da carga parasitária e expressão gênica de citocinas e quimiocinas e) foram analisados de acordo com o tempo de evolução da lesão.

De acordo com alguns autores, a desregulação transitória da resposta imune na fase inicial da LC seria o principal fator relacionado ao desenvolvimento das lesões (Baratta-Masini et al. 2007, Brelaz-de-Castro et al. 2012, Freitas-Teixeira et al. 2012). Nesse contexto, a análise do perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico demonstrou que pacientes do grupo lesão recente apresentaram menor IE das moléculas de ativação CD23 e co-estimulação CD80, acompanhado pela menor produção das citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-17) e moduladoras (IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4) em relação ao grupo lesão tardia. Por outro lado, observou-se que esses pacientes apresentaram maior capacidade fagocítica juntamente com maior IE de monócitos expressando os receptores CD16, TLR-2 e TLR-4 e produção de NO. Diferente do presente estudo, outros autores demonstraram, em populações não-indígenas, que pacientes com lesões recentes ( $< 2$  meses)

apresentaram supressão da resposta *Tipo 1* com baixos níveis de IFN- $\gamma$  e maior produção de IL-10, o que poderia favorecer o crescimento parasitário e progressão da doença. (Ribeiro-de-Jesus et al. 1998, Rocha et al. 1999). Além disso, Baratta-Masini et al. (2007) também mostraram que pacientes com lesões recentes (< 2 meses) apresentaram fenótipo susceptível à infecção com maior produção de citocinas *Tipo 2* (IL-10 e IL-4) em relação aos pacientes com lesões tardias (> 2 meses) que, por outro lado, produziram maiores níveis de citocinas *Tipo 1* (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ). Em outro estudo, Freitas-Teixeira et al. (2012) observaram que enquanto pacientes com lesões iniciais (< 2 meses) apresentaram perfil caracterizado pelo menor percentual de neutrófilos CD28<sup>+</sup> e maior de células T CD4<sup>+</sup>, pacientes com lesões superiores a 2 meses de evolução apresentaram maior percentual de células T CD8<sup>+</sup> e produção de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, bem como maiores níveis séricos de NO, sugerindo que esses pacientes estariam mais aptos à resolução da infecção.

Segundo alguns estudos, a ativação de macrófagos por citocinas da resposta *Tipo 1* (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) ou via interação com receptores *Toll* promovem aumento da expressão da enzima iNOS, direcionando o metabolismo da L-arginina para síntese de NO e eliminação do parasito (Green et al. 1990, Liew et al. 1991, Wanasen & Soong 2008, Horta et al. 2012). No presente estudo, apesar da menor produção de TNF- $\alpha$  e níveis similares de IFN- $\gamma$ , pacientes do grupo lesão recente produziram maiores níveis de NO em relação ao grupo lesão tardia. Dessa forma, análises de correlação foram realizadas com o intuito de verificar se a produção de NO no grupo lesão recente estaria associada a determinada citocina ou marcador de superfície. Essas análises mostraram que os níveis de NO apresentaram forte correlação positiva com o TLR-4 que foi mais expresso em monócitos desse grupo, quando comparado ao grupo lesão tardia. Para as demais citocinas ou marcadores de superfície avaliados nenhuma correlação foi observada (dados não mostrados). De acordo com alguns relatos, as lesões de pacientes infectados pela *L. (V.) braziliensis* são caracterizadas por escassos parasitos (Carvalho et al. 2012, Jara et al. 2013), contudo, observou-se no presente estudo que pacientes do grupo lesão recente apresentaram maior carga parasitária em relação ao grupo lesão tardia, corroborando com dados publicados recentemente por Jara et al. (2013). Além disso, Qadoumi et al. (2002) demonstraram que a redução do número de parasitos nas lesões de pacientes com LC foi relacionada a maior expressão da enzima iNOS em macrófagos. Nesse contexto, apesar da menor produção de NO no grupo lesão tardia, análises de correlação mostraram que a redução da carga parasitária nesse grupo foi diretamente associada a síntese de NO. Por outro lado, nenhuma correlação entre os níveis de NO e a carga parasitária foi observada no grupo lesão recente (dados não mostrados), sugerindo que a

*Leishmania* poderia inibir a ação dessa molécula na fase inicial da infecção. Diante desse perfil balanceado com citocinas moduladoras e inflamatórias (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-17) e síntese de NO associada à destruição do parasito, por que as lesões ainda persistem no grupo lesão tardia? De forma hipotética é possível inferir que o desenvolvimento de mecanismos moduladores e inflamatórios não esteja ocorrendo de forma equilibrada, como observado no grupo TM<sup>+</sup>sL, sendo assim, os níveis das citocinas moduladoras não estariam sendo suficientes para controlar a ação das citocinas inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$ , contribuindo para não resolução da doença.

Com o intuito de melhor compreender quais fatores estariam associados ao desenvolvimento e manutenção das lesões, realizou-se uma análise detalhada do perfil histopatológico e da resposta imune localizada, demonstrando que o infiltrado inflamatório das lesões foi composto por células polimorfonucleares, mononucleares e plasmócitos, bem como presença de granulomas, necrose e formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Em outros estudos com populações não-indígenas, resultados semelhantes foram observados e o quadro histopatológico das lesões variou de um infiltrado inflamatório rico em linfócitos, histiócitos e neutrófilos a uma reação granulomatosa com ou sem necrose (Montenegro 1924, de Magalhães et al. 1982, Bittencourt & Barral 1991, Ritter et al. 1996). Nesse contexto, outros autores observaram que o acúmulo de plasmócitos estaria diretamente associado ao desenvolvimento da lesão na LC (Bomfim et al. 2007, Nylén & Eidsmo 2012). Em relação à visualização do parasito, Melby et al. (1994) demonstraram presença de formas amastigotas de *Leishmania mexicana* em 72,7% das amostras de biópsias analisadas. Além disso, a análise histopatológica mostrou que no grupo lesão recente a maioria dos pacientes apresentou infiltrado inflamatório composto por células mononucleares e polimorfonucleares, enquanto no grupo lesão tardia observou-se predomínio de células mononucleares, conforme dados publicados por Campanelli et al. (2010) que avaliaram uma população não-indígena portadora de LC.

Segundo alguns autores, a susceptibilidade a patógenos intracelulares é, em grande parte, determinada durante a transição da imunidade inata para adaptativa (Fearon & Locksley 1996, Luster 2002). Nesse contexto, o microambiente imunológico induzido pela interação inicial parasito-hospedeiro pode ser crucial para o desenvolvimento ou a resistência à doença (Ward, Bacon & Westwick 1998, Luther & Cyster 2001). No presente estudo, a análise por RT-qPCR de citocinas e quimiocinas no infiltrado inflamatório da lesão mostrou que pacientes do grupo lesão recente apresentaram maiores níveis de transcritos de IL12B, IFNG, TNF, IL10, TGFB1, IL4, CCL2, CCL3, CCL5 e CXCL10 em relação ao grupo lesão tardia.

Por outro lado, Campanelli et al. (2010), utilizando a citometria de fluxo, mostraram que lesões tardias apresentaram maior frequência de células produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$  em relação às lesões recentes. Além disso, Melby et al. (1994) demonstraram maior expressão gênica de TNF, IL10 e TGFB1 em lesões tardias ( $\geq 4$  meses) quando comparado às mais recentes ( $\leq 2$  meses). Os pacientes avaliados por Melby et al. (1994) estavam infectados (*L. mexicana*) por uma espécie de *Leishmania* diferente daquela do presente estudo [*L. (V.) braziliensis*], variável que poderia explicar o perfil de expressão gênica distinto entre os dois estudos. De fato, alguns estudos têm demonstrado que a indução de quimiocinas na LC foi dependente da cepa de *Leishmania* avaliada (Racoosin & Beverley 1997, Teixeira et al. 2005). Contudo, é possível que fatores genéticos (Rosas et al. 2005) e/ou ambientais (Lee et al. 2010, Zhang et al. 2011) estejam envolvidos nesse perfil de expressão gênica diferenciado da população indígena avaliada. Além disso, Quaresma (2011) realizou um estudo de polimorfismo genético de *L. (V.) braziliensis* na comunidade indígena Xakriabá por meio de PCR-RFLP hsp70 (proteína de choque térmico de 70KDa) e Cpb (cisteína proteinase b) e sequenciamento, demonstrando que existem duas populações desse parasito circulando entre os hospedeiros vertebrados. E de forma interessante, verificou-se forte associação entre a população do parasito e o tipo de lesão. Enquanto aqueles com perfil idêntico às cepas referência de *L. (V.) braziliensis* foram relacionados a lesões típicas, parasitos com perfil variante parecem induzir lesões atípicas. No presente estudo, a análise por heat map não mostrou associação entre o perfil imunológico das lesões e o tipo de lesão, no entanto outros estudos serão realizados com o intuito de melhor caracterizar a resposta imune dos pacientes infectados pelo perfil variante de *L. (V.) braziliensis* e se fatores de virulência poderiam estar influenciando o encontro desse perfil diferenciado.

Segundo Nylén & Eidsmo (2012), quando macrófagos são estimulados pelas citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  tornam-se menos “*responsivos*” a ação do IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o que poderia levar a menor destruição da *Leishmania*. Nesse contexto, o perfil panorâmico de expressão gênica de citocinas e quimiocinas, por meio da análise de assinatura, revelou que pacientes do grupo lesão recente apresentaram perfil misto de resposta imune com eventos inflamatórios e moduladores ocorrendo simultaneamente, principalmente devido aos altos níveis de expressão dos genes IL10, TGFB1, CCL3, CCL5 e CXCL10, indicando que a distribuição de citocinas e quimionas na LC é altamente dinâmica e variável de acordo com o tempo de evolução da lesão. Diante do exposto, o microambiente observado na fase inicial da lesão poderia promover o recrutamento de células susceptíveis à infecção ao foco inflamatório, permitindo o crescimento da *Leishmania* e progressão da doença (van Zandbergen et al. 2004).

Além disso, observou-se que pacientes do grupo lesão recente apresentaram também maiores níveis de transcritos das citocinas e quimiocinas inflamatórias (IL12B, IFNG, TNF, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10). Sendo assim, a maior expressão desses biomarcadores poderia estimular o recrutamento e ativação de subtipos celulares específicos ao foco inflamatório como tentativa de combater a infecção, bem como poderia também estar associada à destruição tecidual (Teixeira et al. 2006, Nylén & Eidsmo 2012). Ritter & Moll (2000) demonstraram que a secreção da quimiocina CCL2 atrai células produtoras de IFN- $\gamma$  ao foco inflamatório, promovendo maior ativação de macrófagos e eliminação da *L. major*. De fato, parece que CCL2 exerce papel importante na LC, já que em outro estudo, Ritter et al. (1996) observaram altos níveis dessa quimiocina em lesões de pacientes com cura espontânea da doença, indicando que CCL2 poderia estimular mecanismos microbicidas de macrófagos, favorecendo a resolução da LC. Zaph & Scott (2003) mostraram que a presença da citocina IL-12 levou à indução das quimiocinas inflamatórias XCL1, CCL2 e CXCL10 em linfonodos de camundongos resistentes à infecção pela *L. major*. A administração de CXCL10 recombinante em camundongos BALB/c susceptíveis promoveu maior atividade citotóxica de células NK e resistência a infecção pela *L. major*, sugerindo que essa quimiocina poderia ter papel protetor na LC (Vester et al. 1999). Santiago et al. (2004) observaram que o tratamento com Met-RANTES (antagonista funcional de CCR1 e CCR5) ou anti-CCL5 direcionou a resposta imune para o *Tipo 2*, tornando os camundongos C57BL/6 mais susceptíveis a infecção por *L. major*.

Embora o desenvolvimento da resposta *Tipo 1* seja benéfico na LC, o controle dessa resposta inflamatória é essencial para a resolução da doença (Bacellar et al. 2002, Antonelli et al. 2004). Nesse contexto, análises de correlação entre citocinas produzidas no sangue periférico e citocinas/quimiocinas expressas no infiltrado inflamatório das lesões demonstraram que existe grande interação entre a resposta imune sistêmica e localizada. No grupo lesão recente observou-se que diversos mecanismos inflamatórios ocorrem simultaneamente (correlação positiva entre IFN tecidual e TNF- $\alpha$  sanguíneo; correlação positiva entre CCL5 tecidual e TNF- $\alpha$  sanguíneo; correlação positiva entre IL12B tecidual e IL-17 sanguíneo), o que poderia contribuir para desenvolvimento e manutenção das lesões (Antonelli et al. 2005, Bacellar et al. 2009, Kostka et al. 2009, Boaventura et al. 2010, Oliveira et al. 2011). Por outro lado, verificou-se também associações que poderiam favorecer o crescimento da *Leishmania* e progressão da infecção (correlação negativa entre IL12B tecidual e IL-10 sanguíneo; correlação negativa entre CXCL10 tecidual e IL-10 sanguíneo) (Belkaid, Butcher & Sacks 1998, Nylén & Eidsmo 2012). No entanto, caso essas associações

favoreçam maior produção de IL-12 e CXCL10, promoveria ativação de macrófagos e resolução da LC (Reiner et al. 1994, Carrera et al. 1996, McDowell & Sacks 1999, Vester et al. 1999). As análises de correlação no grupo lesão tardia revelaram que as associações entre citocinas e quimiocinas inflamatórias e moduladoras foram mais equilibradas (correlação positiva entre IL12B tecidual e IL-10 sanguíneo; correlação positiva entre IL4 tecidual e TGF- $\beta$  sanguíneo; correlação positiva entre IFNG tecidual e IL-12 sanguíneo; correlação negativa entre TGFB1 tecidual e IL-10 sanguíneo; correlação positiva entre CXCL10 tecidual e IL-17 sanguíneo), permitindo hipotetizar que os mecanismos desenvolvidos por esses pacientes estariam mais associados à destruição da *Leishmania* e resolução da doença. Contudo a correlação positiva entre TNF tecidual e IL-17 sanguíneo poderia estar associada à manutenção da doença (Lessa et al. 2001, Antonelli et al. 2005, Bacellar et al. 2009, Kostka et al. 2009, Boaventura et al. 2010, Carvalho et al. 2012).

Diante do exposto, os resultados obtidos no presente estudo forneceram informações importantes relacionadas à susceptibilidade e resistência à leishmaniose cutânea causada pela *L. (V.) braziliensis*. Além disso, considerando a necessidade de se ampliar o conhecimento sobre os fenômenos imunopatológicos na LC, este trabalho constituiu-se como uma ferramenta importante para estabelecer proposições futuras, visando o controle da patologia. Por fim, esse foi o primeiro estudo que avaliou aspectos imunológicos da LC em uma população indígena brasileira.





O presente estudo mostrou que monócitos dos pacientes do grupo LC apresentaram menor capacidade em internalizar formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* e perfil ativado, principalmente pelo maior percentual/IE da molécula de ativação CD23, com síntese de altos níveis de TNF- $\alpha$ . Contudo, os níveis de TNF- $\alpha$  correlacionaram de forma negativa com a produção de NO, sugerindo que essa citocina estaria muito mais associada ao desenvolvimento/manutenção das lesões do que controle da doença. Além disso, a análise do perfil fenotípico-funcional de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes e de citocinas e quimiocinas no infiltrado inflamatório das lesões mostrou que pacientes com lesões recentes apresentaram perfil de resposta imune distinto daqueles com lesões tardias. Por fim, observou-se que pacientes do grupo TM<sup>+</sup>sL apresentaram maior capacidade em internalizar formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* com equilíbrio entre a produção de citocinas inflamatórias (IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-17) e moduladoras (IL-10, IL-4) e altos níveis de NO, indicando que esse perfil de resposta imune balanceada e efetora poderia combater a infecção sem provocar dano tecidual.

Por fim, foi possível a identificação e proposição de potenciais biomarcadores associados à resistência à LC (IL-12, IL-17 e NO) e ao desenvolvimento e manutenção da lesão (TNF- $\alpha$ ).



8.1 Ministério da Saúde/Conselho Nacional de Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 355/2008

Registro CONEP: 14689 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE - 0021.0.245.000-07

Processo nº 25000.037372/2008-88

Projeto de Pesquisa: "Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na reserva indígena Xacriabá, Minas Gerais, Brasil"

Pesquisador Responsável: Célia Maria Ferreira Gontijo

Instituição: Centro de Pesquisa René Rachou - MG / Fundação Oswaldo Cruz

CEP de origem: Centro de pesquisa René Rachou / Fundação Oswaldo Cruz / CPqRR / FIOCRUZ

Área Temática Especial: Populações Indígenas

Patrocinador: não consta

Sumário geral do protocolo

O estilo de vida dos povos indígenas e as condições sociais a que estão submetidos favorecem a transmissão de parasitoses, entre elas, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Desde 2001 têm sido registrados casos autóctones de LTA e somente em 2006 foram diagnosticados 48 casos entre os habitantes da reserva. Não se conhece a extensão do problema, pois não existem estudos anteriores sobre a LTA na área e as únicas medidas de controle adotadas são o diagnóstico dos casos suspeitos e tratamento dos doentes.

O projeto propõe estudar diferentes aspectos da leishmaniose tegumentar relacionados à doença humana, aos vetores flebotomíneos e aos possíveis reservatórios na reserva indígena Xacriabá. Paralelamente ao estudo da infecção humana, será realizada captura de animais silvestres, coleta de amostras biológicas de animais domésticos e coleta de flebotomíneos, para a detecção e identificação das espécies de *Leishmania* sp.

O objetivo geral do projeto é estudar aspectos da leishmaniose tegumentar relacionados à doença humana, aos flebotomíneos e aos possíveis reservatórios, na reserva indígena Xacriabá, Minas Gerais.

Os objetivos específicos são: 1- Identificar os casos clínicos e subclínicos de LTA em uma amostra populacional da reserva Xacriabá, utilizando avaliação clínica, técnicas sorológicas e moleculares; 2- Estimar a prevalência e a incidência da doença, da forma subclínica, de recidivas e reinfeção na população; 3- Identificar fatores de risco para a doença clínica e subclínica; 4- Identificar biomarcadores celulares e moleculares da resposta imune de casos clínicos e da forma subclínica de LTA, visando caracterizar possíveis indicadores de resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania*; 5- Determinar as espécies de flebotomíneos e a(s) possível(is) espécie(s) vetor(es) na área de estudo; 6- Estabelecer a flutuação sazonal das espécies de flebotomíneos e correlacioná-la com variáveis bioclimáticas; 7- Estudar o comportamento das espécies de flebotomíneos com relação à endofilia, exofilia e preferência alimentar; 8- Verificar a infecção natural por *Leishmania* spp. dos animais domésticos, silvestres e dos flebotomíneos capturados; 9- Identificar a(s) espécie(s) de *Leishmania* que ocorrem nos casos humanos, nos animais domésticos, silvestres e flebotomíneos infectados, utilizando métodos moleculares; 10- Correlacionar a distribuição espacial dos casos humanos com a presença de espécies de flebotomíneos vetoras e animais infectados; 11- Estudar a variabilidade genética de *L. braziliensis* de isolados provenientes dos diferentes hospedeiros; 12- Pesquisar a ocorrência de estruturação genética populacional nas diferentes espécies de Didelphidae capturadas na reserva a partir da análise de marcadores microssatélites e comparar os dados obtidos em subpopulações silvestres e urbanas.

A metodologia informa que será realizado um estudo seccional de base populacional, utilizando-se um inquérito em uma amostra representativa da população, consistindo de entrevistas familiares, exame clínico e diagnóstico laboratorial. Durante o período de coletas será realizado um estudo caso-controle e o seguimento de uma amostra de casos (clínicos e subclínicos) e de não infectados, para avaliação de fatores de risco para infecção e doença.

Cont. Parecer CÔNEP 355/2008

Os procedimentos a serem realizados são: 1. entrevistas familiares; 2. exame clínico; 3. diagnóstico laboratorial (reação intradérmica de Montenegro, ensaio imunoenzimático, métodos parasitológicos e moleculares); 4. estudo caso-controle e o seguimento de uma amostra de casos (clínicos e subclínicos) e de não infectados, para avaliação de fatores de risco para infecção e doença.

Os critérios de inclusão da 1ª Etapa são: (1) seleção dos domicílios: registro do número de domicílios de cada aldeia, cálculo do número de domicílios a serem trabalhados em cada aldeia, sendo que a representação de cada aldeia será proporcional ao número de domicílios existentes e seleção por amostragem sistemática dos domicílios participantes do estudo utilizando-se os croquis das aldeias; (2) seleção dos participantes do estudo: todas as pessoas com idade entre cinco e oitenta anos, nos domicílios selecionados serão elegíveis para o estudo. Serão excluídas do estudo mulheres gestantes e nutrízes; (3) todos os participantes da entrevista serão convocados para realização da IDR, sorologia e exame clínico. Os domicílios selecionados serão assinalados no mapa da reserva indígena disponível na FUNASA. Em caso de domicílio fechado, esse será substituído pelo vizinho mais próximo, à direita, esquerda ou em frente, nessa ordem. Caso o morador selecionado para o estudo esteja ausente do domicílio no momento da visita, será agendada nova visita a casa. Caso o morador selecionado não concorde ou não possa participar, a casa será substituída, utilizando os mesmos critérios descritos para o domicílio fechado.

Na 2ª Etapa os casos clínicos e subclínicos confirmados e uma amostra de participantes negativos identificados durante o inquérito serão selecionados para avaliação de fatores de risco relacionados à doença e infecção. Também serão incluídos no estudo caso-controle os casos procedentes de outras aldeias ou pólos, identificados pelo sistema de saúde local durante o período de coletas na área que será de 12 meses.

#### Local de realização

Trata-se de um estudo em populações indígenas e será conduzido em duas aldeias do Pólo Brejo Alta Fome (Embaúba I e Embaúba II) por concentrarem o maior número de casos humanos recentes e altas prevalências de cães soropositivos (MS/FUNASA, 2007).

O município de São João das Missões possui uma população de 12.489 habitantes. A reserva Xacriabé ocupa uma área de 530,74Km<sup>2</sup>, que corresponde a 78,97% da superfície total do município. É constituída por 52 aldeias formando 5 pólos base com população total estimada de 6.500 habitantes (IBGE, 2006, FUNASA, 2006).

A reserva indígena foi selecionada para o estudo devido ao grande número de casos de LTA registrados nos últimos anos. No período de 2001 a 2006 foram registrados 181 casos.

A amostra para o estudo será de 220 sujeitos.

#### Apresentação do protocolo

A Folha de Rosto está preenchida e o protocolo devidamente instruído. O currículo da pesquisadora está anexado ao projeto. A planilha de orçamento financeiro está explicitada. O cronograma de atividades está descrito indicado para o período de 2 anos. O plano de divulgação dos resultados está descrito no projeto.

#### Comentários

É um projeto de grande relevância, pois os resultados poderão trazer contribuições importantes, já que as manifestações clínicas e a sensibilidade do parasito às drogas podem variar dependendo da espécie de *Leishmania* como também das condições imunológicas do hospedeiro. Nesse contexto, diversos estudos têm chamado a atenção para a importância dos padrões de resposta imune celular e humoral no estabelecimento das diferentes manifestações clínicas da LTA. O estudo de tais padrões permitirá não apenas identificar possíveis mecanismos associados ao estabelecimento de casos ativos e de formas subclínicas da LTA, mas também eleger biomarcadores visando caracterizar possíveis indicadores de resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania*. Por ser uma parasitose que apresenta grande diversidade clínico-epidemiológica e constantes mudanças nos padrões epidemiológicos de transmissão, a LTA é considerada uma doença de difícil controle. As estratégias para o seu controle devem ser específicas, conforme a situação epidemiológica de cada local e região. A detecção de casos suspeitos, a confirmação do diagnóstico e tratamento precoce, a identificação do agente etiológico circulante na área, o conhecimento das áreas de transmissão e dos hábitos e atitudes que

Cont. Parecer CONEP 388/2008

favorecem a transmissão, bem como a caracterização da resposta imune dos hospedeiros humanos são fatores importantes para definição de medidas profiláticas específicas para cada local e redução da incidência da doença.

O plano amostral, os procedimentos de coleta de amostras estão definidos e a análise estatística indicada e considerada compatível com o delineamento do estudo.

Os participantes incluídos no estudo receberão benefícios imediatos e a comunidade e médico a longo prazo.

O estudo inclui crianças ou menores de 18 anos, mas nesses casos os responsáveis responderão à entrevista e fornecerão o consentimento para sua inclusão.

Cientificamente, o projeto está muito bem instruído. A equipe técnica é composta por 12 pesquisadores do Instituto René Rachou, 9 pesquisadores da UFMG (Faculdade de Medicina e de Biologia) e mais 2 integrantes da FUNASA.

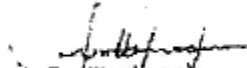
#### Recomendações

1. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE utilizou vários termos técnicos para uma população indígena. Por exemplo: "exames clínicos, sorológicos e moleculares", "teste de Montenegro para diagnosticar leishmaniose tegumentar", "biópsia de um pequeno fragmento de leishmania", entre outros. Solicita-se que o TCLE seja revisado e que os membros da equipe que pertencem à FUNASA colaborem com os pesquisadores no sentido de adequar o TCLE.
2. Que seja obtida a presença das lideranças indígenas, que deverá ser obtida antes da abordagem dos participantes, conforme item III.2.4 da Resolução CNS 304/00.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima e encaminhar à CONEP as recomendações cumpridas antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 19 de junho de 2008.

  
Gyselle Sáadi Tannous  
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

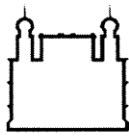
Em 23/06/2008 -

A' Dr. Celso Jantiga

Para ciência e pendências.

Favor encaminhar ao CEP/UFMG, tão logo disponíveis, o TCLE modificado e o documento de ausência (item 2 caso acima), para avaliação e registro no seu projeto.

8.2 *Ministério da Saúde/Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisa René Rachou/Comitê de Ética*



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Comitê de Ética

### ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA SUBMETIDO AO CEPESH/CPqRR

Protocolo CEPESH/CPqRR nº: 021/2007

**Projeto de Pesquisa:** "Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na reserva indígena Xacriabá, Minas Gerais, Brasil"

**Pesquisador Responsável:** Célia Maria Ferreira Gontijo

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

**Data de entrada no CEP:** 4/12/2007

**Parecer:**

O trabalho tem por objetivo estudar aspectos da leishmaniose tegumentar relacionados à doença humana, aos transmissores e possíveis reservatórios na reserva indígena Xacriabá em Minas Gerais.

**Avaliação:** O projeto apresenta alta relevância tendo em vista a prevalência e dificuldade de controle da leishmaniose nas comunidades indígenas em função das condições de vida das mesmas em íntimo contato com transmissores e reservatórios da doença. Conhecendo a prevalência e distribuição da doença e demais agentes envolvidos no ciclo de transmissão teremos novos dados para planejamento do combate à mesma. Além disto está garantida a propedêutica adequada e tratamento a todos os casos detectados. Embora haja sempre questionamentos em relação a pesquisas envolvendo povos indígenas, neste caso a pesquisa tem objetivos claros de benefício de outros povos indígenas com o resultado, pois as conclusões serão facilmente aplicáveis a populações semelhantes, e além disto o material coletado será utilizado exclusivamente na pesquisa atual. Os termos de consentimento são claros e as devidas licenças junto à FUNAI e FUNASA serão providenciadas.

O projeto possui garantia de financiamento através da FIOCRUZ. Os pesquisadores envolvidos apresentam vasto currículo e ampla experiência na área.




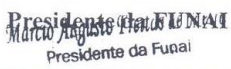
**Conclusão:** Tendo em vista o projeto cumprir todos os preceitos legais sugerimos a aprovação do mesmo por esse comitê.

Belo Horizonte, 11 de dezembro de 2007.

João Carlos Pinto Dias  
Coordenador do CEPESH-CPqRR

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

8.3 *Ministério da Justiça/Fundação Nacional do Índio - Autorização para ingresso em Terra indígena*

 <b>MINISTÉRIO DA JUSTIÇA</b> <b>FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO</b>		
<b>AUTORIZAÇÃO PARA INGRESSO EM TERRA INDÍGENA</b>		Nº: 149 / CGEP/08
<b>IDENTIFICAÇÃO</b>		
Nome: Célia Maria Ferreira Gontijo		Processo: nº.2098/08
Nacionalidade: brasileira	Identidade: RG nº.M-663908 SSP MG	
Instituição/Entidade: Laboratório de Leishmanioses – Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ		
Patrocinador:		
<b>OBJETIVO DO INGRESSO</b>		
Desenvolver o projeto de pesquisa científica intitulada “Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil”.		
<b>EQUIPE DE TRABALHO</b>		
Nome	Nacionalidade	Identidade
Elizabeth Castro Moreno*****	brasileira*****	RG 867963 SSP MG
Patrícia Flávia Quaresma*****	brasileira*****	RG 11616996 SSP MG
Filipe Augusto Maximiano Madeira*****	brasileiro*****	RG 11030749 SSP MG
Heitor Moraes Cunha*****	brasileiro*****	CRBio 44441/04-D MG
Lutiana Amaral de Melo*****	brasileira*****	RG 9117142 SSP MG
Edelberto Santos Dias*****	brasileiro*****	CRBio 13446/4-D MG
Ricardo Andrade Barata*****	brasileiro*****	CRBio 160154 MG
Adriano Pereira Paglia*****	brasileiro*****	RG 2099566 SSP MG
Terra Indígena: Xakriabá		Etnia: Xakriabá
Administração Regional: Governador Valadares		Posto Indígena: Xakriabá
<b>VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO</b>		
Início: 12 de outubro de 2008		Término: 12 de outubro de 2009
<b>OBSERVAÇÕES</b>		
* Remeter à Funai/Coordenação Geral de Estudos e Pesquisas - CGEP, duas cópias da monografia, relatórios, artigos, livros, gravações, imagens e outras produções oriundas do trabalho realizado.		
* Esta autorização não inclui cessão de uso de imagem e som de voz dos índios, nem acesso a conhecimentos tradicionais associados a biodiversidade.		
Autorizo:		
Brasília, 17 de setembro de 2008.  		

8.4 *Publicação científica do estudo intitulada “Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis”, Costa-Silva et al. Molecular Immunology, 2013*

Molecular Immunology 57 (2014) 74–85



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/molimm](http://www.elsevier.com/locate/molimm)



Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis



Matheus Fernandes Costa-Silva<sup>a</sup>, Luciana Inácia Gomes<sup>b</sup>, Olindo Assis Martins-Filho<sup>a</sup>, Renata Rodrigues-Silva<sup>a,b</sup>, Janaína de Moura Freire<sup>c,d</sup>, Patrícia Flávia Quaresma<sup>d</sup>, Marcelo Antônio Pascoal-Xavier<sup>c,e</sup>, Tiago Antônio de Oliveira Mendes<sup>f</sup>, Rogéria Serakides<sup>g</sup>, Danielle Alves Gomes Zauli<sup>a</sup>, Ana Carolina Campi-Azevedo<sup>a</sup>, Maria Norma Melo<sup>f</sup>, Célia Maria Ferreira Gontijo<sup>d</sup>, Vanessa Peruhype-Magalhães<sup>a</sup>, Andréa Teixeira-Carvalho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório de Pesquisas Clínicas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>d</sup> Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>e</sup> Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>f</sup> Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

<sup>g</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

\* E-mail: [andreat@cpqrr.fiocruz.br](mailto:andreat@cpqrr.fiocruz.br); [atceteixeira@gmail.com](mailto:atceteixeira@gmail.com)

### Abstract

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a chronic inflammatory disease caused by dermatropic *Leishmania* species belonging to the *Viannia* subgenera, with *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* considered the main agent in Brazil. After infection, a local inflammatory process is initiated,



inducing the expression of several cytokine/chemokine genes. We evaluated the immunity to CL of patients living in the indigenous community Xakriabá, Minas Gerais state, Brazil, by performing detailed analyses of the mRNA expression of different cytokines and chemokines in CL lesions, considering the time evolution (recent or late). We also studied the profile of the inflammatory infiltrate by histopathological analysis. The histopathological features of recent CL lesions showed an intense inflammatory reaction, characterized by the presence of both mononuclear and polymorphonuclear cells, whereas late CL lesions exhibited a predominance of mononuclear leukocytes. The gene expression of cytokines/chemokines in skin biopsies from the CL group showed higher transcript levels of modulatory (IL10 and TGF $\beta$ 1), anti-inflammatory (IL4), and pro-inflammatory (TNF, IFNG, IL12B, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10) biomarkers in recent lesions than in late lesions. Our findings suggest that differential gene expression of cytokines and chemokines found in skin lesions from CL patients is associated with time evolution of lesions.

*Keywords:* Cutaneous leishmaniasis, Localized immune response, Cytokines, Chemokines.

## 1 Introduction

Leishmaniasis is considered an emerging and re-emerging disease. Its incidence has increased in the last few decades (Reithinger et al., 2007; Goto and Lindoso, 2010), mainly due to human migration, deforestation, urbanization, and adaptation of the *Leishmania* parasite to additional vectors and mammalian hosts (Ferro et al., 2011). Leishmaniasis has a global estimated prevalence of 12 million cases, with approximately 2 million new cases each year (1.5 million cases of tegumentary leishmaniasis and 500,000 of visceral leishmaniasis). The disease occurs in 88 countries throughout Europe, Africa, Asia, and the Americas, and 350 million people are at risk of contracting leishmaniasis (Murray et al., 2005; Ameen, 2010; WHO, 2013).

The disease is caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania*, which are transmitted by phlebotomine sand flies (Goto and Lindoso, 2010). The spectrum of clinical manifestations is large: in the skin, these range from localized cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis to diffuse cutaneous leishmaniasis (Teixeira et al., 2006).

*Leishmania Viannia braziliensis* is the primary cause of tegumentary leishmaniasis in Brazil. Cutaneous leishmaniasis (CL), the most common form of tegumentary leishmaniasis, is characterized by the appearance of a single or a few ulcerated skin lesions (Bittencourt and Barral, 1991; Giudice et al., 2012).

The occurrence of CL in Brazilian Indian tribes has been little explored. The first reports were described in the 1950s and 1960s in the Mato Grosso state (Forattini and Dos Santos, 1956; De Carneri et al., 1963). Pena and Heller (2008) conducted a study on the indigenous Xakriabá tribe (Minas Gerais, Brazil), demonstrating that the Indians' precarious sanitary and housing conditions contribute to the spread of the disease. To aggravate the situation, autochthonous cases of CL have been recorded since 2001 (MS, 2007a). Quaresma et al. (2011) reported a prevalence of 8.6% cases of CL in the Xakriabá tribe.

As part of their cycle life, *Leishmania* are injected into the vertebrate host as a promastigote, which is phagocytosed by different phagocytic cells in the host. Within cells of the mononuclear phagocyte system, promastigotes differentiate into amastigotes and then proliferate, establishing the infection (Goto and Lindoso, 2010). After infection, a local inflammatory process is initiated (Müller et al., 2001). According Ritter et al. (1996), a major characteristic of *Leishmania*-infected skin lesions is the massive infiltration of macrophages with multiple functions. They serve as host cells for the intracellular replication of parasites, as modulators of the specific immune activity by presenting parasite antigen to T cells, and as the ultimate mediators of the host response.

In addition, several reports have shown that antimicrobial effectors are activated in macrophages and, as a consequence, resistance or susceptibility of the host to *Leishmania* infections correlates with distinct patterns of cytokine production in the infected skin (Pirmez et al., 1993; Cáceres-Dittmar et al., 1993; Melby et al., 1994). In fact, infection with *Leishmania* induces the expression of several cytokine/chemokine genes (Melby et al., 1994; Racoosin and Beverley, 1997; Ritter and Körner, 2002; Antoniazzi et al., 2004). This could be beneficial to the parasite through recruitment of host cells that it can infect and survive within while it proliferates (van Zandbergen et al., 2004). For example, *L. major* has been shown to actively modify the chemokine profile at the infection site and thus recruit cells that will favor the development of persistent infection (Katzman and Fowell, 2008). Additionally, the virulence of some species of *Leishmania* is partly due to their ability to repress the induction of pro-inflammatory cytokines and chemokine genes, making their entry less detectable to the host (Matte and Olivier, 2002; Ji et al., 2003).

Many aspects of the immune response to *Leishmania* have been studied, particularly cytokine and chemokine interactions with cells in different cellular compartments. It is well established in mouse models that resistance to CL is associated with the development of T-helper type 1 (Th1) response, characterized by the production of interleukin (IL)-12 and

gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), whereas genetic strains that mount the Th2 response with IL4 and IL10 cytokine production are susceptible (Awasthi et al., 2004).

However, the clear Th1/Th2 dichotomy observed in murine CL has not been demonstrated in humans, because the host immune response and disease outcome during leishmaniasis are far more complex than in mice (Castellano et al., 2009). It is clear, however, in both human and experimental models of the disease that cytokines and chemokines play a critical role in shaping the nature of the host immune response to *Leishmania* infection (Teixeira et al., 2006; Cummings et al., 2010).

In the present study, we evaluated the localized immune response in CL patients living in the indigenous community of Xakriabá, Minas Gerais state, Brazil. We performed detailed analyses of the mRNA expression of different cytokines and chemokines in CL lesions, considering the time evolution, the number, and the type of lesions. We also studied the profile of the inflammatory infiltrate by histopathological analysis. The characterization of the localized immune response in the inflammatory infiltrate of CL lesions provided us with a better understanding of the mechanisms involved in the establishment and maintenance of this disease. Also, this study provided a rare opportunity to study immunological aspects related to CL in an indigenous population.

## **2 Population, materials, and methods**

### *2.1 Study area*

The Xakriabá Indigenous Reserve is located in São João das Missões municipality (14°53'01"S, 44°05'26"W) in northern Minas Gerais State, Brazil. The reserve covers 78% of the entire municipality and has a population of 7813 inhabitants (MS, 2012). Between 2001 and 2008, 224 cases of CL were recorded in Xakriabá Territory (Quaresma et al., 2011). Since 2008, a large study has been conducted in this reserve, addressing measures to prevent and control the transmission of CL. All actions have been conducted by the Family Health

Program, currently adopted by the Brazilian Unified Health System, which is also located in Xakriabá Territory.

## 2.2 Study population

Eighteen indigenous patients with a diagnosis of CL were included in this 4-year study (2009–2012). The selection criteria for inclusion was patients with skin lesions suggestive of CL who had presented a positive Montenegro skin test (Biomanguinhos/FIOCRUZ); presence of *Leishmania* parasites by Giemsa-stained imprints of biopsy fragments; and/or parasite isolation in the culture medium (tubes containing blood agar-enriched LIT medium maintained at  $25\pm 1$  °C) and detection of *Leishmania* DNA by PCR. The identification of *Leishmania* species was performed through both biochemical and molecular techniques, according to protocols described previously (Cupolillo et al., 1994; Garcia et al., 2004). The exclusion criteria were patients with alcohol addiction; the presence of clinically manifested systemic disease; HIV infection or other immunosuppressive disease; use of immunosuppressive agents; pregnancy; patients with severe anemia; and patients with previous specific leishmaniasis treatment. All patients received specific treatment for CL at the Brazilian Family Health Program (meglumine antimoniate, Glucantime, 20 mg kg/day for 20 days), as recommended by the Brazilian Ministry of Health guidelines (MS, 2007b). Skin biopsies were taken before treatment and snapped frozen in liquid nitrogen.

Table 1 shows demographical and clinical data of the study population. The patients were categorized into two groups according to the time of lesion appearance, which ranged from 1 to 49 months: (1) recent, those in whom lesions appeared within the previous 3 months, and (2) late, those in whom lesions appeared more than 3 months previously (Jara et al., 2013). Furthermore, the number (one or more) and type of lesion (typical or atypical) were evaluated following the criteria described previously (MS, 2006; MS, 2007b; Guimarães et al., 2009).

Normal skin tissues were also collected from five indigenous individuals (Table 1), who constituted a control group, and preserved in *RNAlater* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). These subjects underwent surgery at a hospital in São João das Missões, which supplies health services to the Xakriabá Reserve.

### *2.3 Ethical issues*

The study was conducted in agreement with the Helsinki Declaration and Resolution no. 196/1996 of the National Health Council at the Brazilian Ministry of Health, which regulates research involving human subjects in Brazil, and Resolution no. 304/2000, which regulates research involving Indians. The Research Ethics Committee at René Rachou Research Center (CEPSH/CPqRR no. 021/2007), and the National Committee for Research Ethics (CONEP: 14689) previously approved the informed consent forms and procedures. Written informed consent was obtained from all adults, and the children were formally included in the study only if the free and informed consent form was signed by their parents or legal guardians. This project was conducted with the permission of the Indigenous National Foundation (FUNAI, license no. 149/CGEP/08) to enter indigenous lands.

### *2.4 Histopathological analysis*

Skin tissue samples from 16 indigenous CL patients and from 4 control patients were fixed in buffered formalin, processed for paraffin embedding using the standard protocol (de Magalhães et al., 1986a; Bittencourt and Barral, 1991), and the sections were stained by hematoxylin-eosin. Histologic sections were examined under a microscope (Zeiss AXIO OBSERVER.A1, Carl Zeiss, Jena, Germany) to determine cell and tissue characteristics of the inflammatory infiltrate and to classify lesions according to the criteria of de Magalhães et al. (1986a). The images displayed in 20× and 63× objectives were digitized with a camera

coupled to the microscope (AxioCam MRc, Carl Zeiss) using the program AxioVision LE (version 4.8.2.0, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany).

### *2.5 Isolation of total RNA from skin tissues*

Total RNA from skin tissues was extracted using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. The extraction was carried out using a cryostat under RNase-free conditions, and approximately 50 cuts of 4  $\mu\text{m}$  were made in each frozen skin sample. The concentration of total RNA was determined by the Qubit Fluorometer (Life Technologies) using the Quant-iT RNA Assay Kit (Life Technologies).

### *2.6 Gene expression analysis by reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR)*

Eleven genes (*IL4*, *IL10*, *IL12B*, *TGFBI*, *TNF*, *IFNG*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL5*, *CXCL10*, *ACTB*) were chosen for relative quantitative assessment. The primers used were selected from the literature or designed following stringent validation criteria: the amplicon sizes had between 80 and 200 bp, and only the primers that amplified regions at exon–intron junctions were chosen (Table 2).

RT-qPCR optimization was established following the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009), and the primer concentrations are shown in Table 2. Primer matrix experiments were conducted by selecting, for each gene, the primer concentration that provides the lowest  $C_t$  and the highest  $\Delta R_n$  using a fixed amount of target template. As template, a cDNA sample from normal skin tissue was used and a no template control was included to assess primer–dimer formation or nonspecific amplification. The specificity of each qPCR product was checked by a dissociation curve and polyacrylamide gel electrophoresis.

RT-qPCR analysis was used to compare the transcript levels between CL lesions and the control samples from normal skin. The cDNA synthesis was performed at 50 ng of total

RNA using random hexamers and the Omniscript RT kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions.

The qPCR reaction mixtures consisted of 1.0 or 2.0 (*IL4*)  $\mu\text{L}$  of cDNA (Table 2), 12.5  $\mu\text{L}$  of Power Syber Green PCR Master Mix 2X (Life Technologies), and the specific primer concentration for each transcript evaluated in the study (Table 2). The final volume of 25  $\mu\text{L}$  was added to 96-well Optical Reaction Plates (Life Technologies) for amplification and quantification in the StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies). For each specific set of primers, all individual samples were run in two technical replicates, and two internal controls were included to assess both potential genomic DNA contamination (no reverse transcriptase added) and the purity of the reagents used (no cDNA added). The baseline and threshold values were adjusted for each assay using StepOne software version 2.1 (Life Technologies). Thermal cycling consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 sec, and 60 or 62 °C (*IL12B* and *TNF*) (Table 2) for 1 min. A final melting curve analysis for confirmation of primer specificity was performed at an initial temperature at 95 °C for 15 sec followed by 60 °C for 1 min, and gradual heating at 0.3 °C/sec to 95 °C. The melting temperature of amplicons was automatically determined by the software.

The relative quantification procedure was chosen following a validation experiment to evaluate the PCR efficiency and  $R^2$  evaluation for each target, as well as a reference gene by using standard curves with serial dilution of a cDNA sample obtained from a normal skin tissue (control) (Table 2). The results were expressed using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\text{Ct}_{\text{target gene}} - \text{Ct}_{\text{ACTB}})_{\text{target sample}} - (\text{Ct}_{\text{target gene}} - \text{Ct}_{\text{ACTB}})_{\text{control sample}}}$  equation (Livak & Schmittgen 2001). The *ACTB* gene was chosen as the reference gene because of its uniform expression throughout tissue samples evaluated.



### *2.7 Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.0 (San Diego, CA, USA). The Mann-Whitney test was used to compare differences between groups. In all cases, differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

### *2.8 Heat map analysis*

The heat map representation was designed in R language (R Development Core Team, 2011) using a gplots library with data normalized by Z-score. Hierarchical cluster of patients was carried out with hclust library (Langfelder and Horvath, 2012).

### *2.9 Cytokine and chemokine signatures*

The cytokine and chemokine signatures were first assessed to identify low and high cytokine producers, as previously proposed by Luiza-Silva et al. (2011a). Modulatory/anti-inflammatory/inflammatory cytokine and chemokine signatures triggered in the recent or late lesion groups were compared by overlapping the ascendant profiles of the groups, as proposed by our group (Campi-Azevedo et al., 2012). Differences were considered to be relevant when the frequency for a given cytokine or chemokine emerged outside the 50th percentile. The use of 50th percentile as a limit to identify relevant differences in the cytokine and chemokine signatures between groups was previously proposed by Campi-Azevedo et al. (2012). This approach was shown to be effective at detecting subtle changes in the cytokine and chemokine signatures that were not detectable by conventional statistical approaches.

### *2.10 Gene correlation network*

The Spearman's rank correlation test using R language (R Development Core Team, 2011) was performed to construct gene correlation networks. A correlation matrix containing all pairwise Spearman's test  $p$ -values less than 0.05 was used to design the networks, considering

genes as vertices and edges as the correlation between two specific genes (Fukushima et al., 2011). The statistical significance of each network was calculated by the number of identical networks obtained from 1000 random evaluations, using the function `randomGraph` of graph library in R language, where  $p < 0.05$  was considered significant.

### **3 Results**

#### *3.1 Characterization of the study population*

The Table 1 shows clinical and epidemiological details of the study group: 18 indigenous patients with diagnosis of CL, and 5 Indians as the control group were evaluated. For the latter, the average age was  $44.6 \pm 22.4$  years (15 to 72 years), including two women and three men. The average age in the CL group was  $27.8 \pm 16.0$  years (8 to 73 years), and it was composed of 6 women and 12 men. Nine patients showed recent lesions, and nine showed late lesions (average of  $11.6 \pm 15.2$  months; ranging from 1 to 49 months). Eleven patients had one lesion, and seven had more than one. Eight patients presented typical lesions, and 10 presented atypical lesions. The lesions of the patients with more than one lesion were mostly located on the upper and lower limbs, and the atypical lesions were exophytic, without clear borders and were sometimes crusted.

#### *3.2 Histopathological analysis*

The histopathological analysis was performed on skin tissue samples from four indigenous individuals belonging to the control group, and no changes were observed (Table 1; Figure 1A, B). In contrast, in the CL group, distinct inflammatory infiltrates were observed, and *Leishmania* was seen in 81.3% of the tissue samples analyzed (Table 1). Thus, we observed lymphocytic infiltrate containing superficial and perivascular dermal distributions (Figure 1C, D). We also observed mixed inflammatory infiltrate rich in lymphocytes, plasma cells, and histiocytes, which occasionally are phagocytizing amastigotes. This infiltrate presented a

diffuse and deep distribution (Figure 1E–H). Furthermore, in the eight patients (CL01, CL02, CL05–CL07, CL13–CL15) who presented both intense or diffuse mixed inflammatory infiltrate, rich in lymphocytes and plasma cells, we observed the presence of necrosis and granulomas with multinucleated giant cells in 87.5% and 25.0% of cases, respectively (Table 1).

In most patients with recent lesions, the inflammatory infiltrate showed a predominance of polymorphonuclear and mononuclear cells, whereas in those patients with late lesions the inflammatory infiltrate presented a greater number of mononuclear cells. No other significant differences between the groups were observed in the parameters evaluated. Also, no clear difference was observed when the patients were categorized according to the number or type of lesions.

### *3.3 Heat map and hierarchical cluster analyses*

To verify the gene expression profile associated with the lesion subcategories (time evolution, number, and type of CL lesion) in the indigenous patients, we constructed a matrix in a heat map representation (Figure 2). The heat map analysis showed that the time evolution of lesions had a great impact on the levels of gene expression observed. Using this approach, it was possible to segregate a distinct immunological profile between recent and late lesion groups, revealing high levels of CCL5 expression in the recent lesion group and increased expression of IFNG and IL10 in the late lesion group. However, we found that the number and type of lesions showed only a slight association with the gene expression profile of patients, allowing no clear segregation between their subgroups. Therefore, the following analyses consider only time evolution of lesions as a parameter associated with gene expression profile in skin tissues of CL patients.

### *3.4 Gene expression profile in skin tissues from indigenous patients with CL according to the time evolution of lesions*

Higher transcript levels of modulatory (IL10 and TGFB1), anti-inflammatory (IL4), and pro-inflammatory (TNF, IFNG, IL12B, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10) cytokines and chemokines were found in recent lesions as compared with late lesions (Figure 3).

### *3.5 Overall pattern of modulatory/anti-inflammatory and inflammatory cytokine and chemokines*

In an effort to detect additional differences, we determined the overall pattern of gene expression according to time evolution of lesion. First, we drew up the global signature of genes that showed high mRNA expression for modulatory/anti-inflammatory/inflammatory cytokines and chemokines according to ascending frequencies.

Analysis of relative gene expression signatures of cytokines and chemokines in the recent lesion group showed an inflammatory profile with clear modulation, mainly due to high expression levels of *IL10*, *TGFB1*, *CCL3*, *CCL5*, and *CXCL10*. Furthermore, in the late lesion group, we observed a balanced immunological profile with prominent participation of IL4 and discrete action of TNF, IL12B, and IFNG. The ascendant curves of relative gene expression of cytokines and chemokines showed that recent lesions were characterized by the following sequence  $IL4 < TNF = IFNG = IL12B = CCL2 = IL10 = TGFB1 < CCL3 = CCL5 = CXCL10$ , whereas the late lesions were characterized by  $CXCL10 < CCL3 = CCL5 < CCL2 = IL10 = TGFB1 = TNF = IFNG = IL12B < IL4$  (Figure 4, top panel). In late lesions, the overlap analysis of signatures showed a significant reduction of the expression of all cytokines and chemokines tested (except for IL4) when compared with recent lesions. The analysis of IL4 showed increased expression of this cytokine in the late lesion group as compared with the recent lesion group (Figure 4, bottom panel).

### 3.6 Gene correlation network

To evaluate the putative relationships among the genes assessed, we built networks where the vertices represent the cytokines and chemokines and the edges represent positive correlations between two genes (Figure 5). The network of response to *L. braziliensis* infection was composed of nine genes, and their topology of correlation showed high statistical significance ( $p=0.002$ ). After categorization according to time evolution of lesion, we observed that only the late lesion subnetwork showed statistical significance ( $p=0.016$ ). Furthermore, we found that the two networks were characterized by correlations between modulatory and inflammatory cytokines and chemokines, highlighting that *IFNG*, *CXCL10*, *CCL2*, and *IL12B* formed a cyclic structure present in both networks.

## 4 Discussion

To better understand the immunological mechanisms associated with the development and maintenance of CL, we investigated this infectious disease in lesions from indigenous CL patients. We evaluated simultaneously the RNA expression of distinct cytokines (IL10, TGFB1, IL4, TNF, IFNG, IL12B), and chemokines (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10) considering the time evolution, number, and type of CL lesions. In addition, we also evaluated the cellular composition of the inflammatory infiltrate in CL skin lesions.

The histopathological analysis showed an inflammatory infiltrate composed of polymorphonuclear, mononuclear cells, and plasma cells as well as the presence of granulomas, necrosis, and *Leishmania* amastigotes. Similarly, studies with non-indigenous patients demonstrated that the histopathological picture of CL lesions varies from a massive lymphohistiocytic and neutrophilic infiltrate to a granulomatous reaction with or without necrosis (Bittencourt and Barral, 1991; Ritter et al., 1996; Montenegro, 1924; de Magalhães et al., 1982). According to other studies, B cells and plasma cells are found in lesion tissue, and the assessment of B cells in lymph node aspirates from CL patients with lymphadenopathy

implicates an association between accumulation of plasma cells and lesion formation (Bomfim et al., 2007; Nylén and Eidsmo, 2012). Furthermore, corroborating our data, Melby et al. (1994) visualized in histological sections *Leishmania* amastigotes in 72.7% of the biopsies analyzed. In addition, our histopathological analysis also revealed that patients with recent lesions showed inflammatory infiltrate composed of mononuclear and polymorphonuclear cells, whereas infiltrate in the late lesion group was composed mainly of mononuclear cells, as we reported previously in a study of non-indigenous population (Campanelli et al., 2010).

Several studies have shown the influence of the time evolution of lesions in the immunological profile of CL patients. Those studies used different periods to define recent and late lesions, which makes it difficult to compare their results (Melby et al., 1994; Baratta-Masini et al., 2007; Campanelli et al., 2010; Hejazi et al., 2012; Jara et al., 2013). In our study, the patients were categorized in two groups: (1) recent, those in whom lesions appeared within the previous 3 months, and (2) late, those in whom lesions appeared more than 3 months previously. This categorization was based on a heat map analysis that showed a strong association between time evolution of lesion and gene expression profile of cytokines and chemokines. According to this analysis, we found that patients with recent lesions showed a gene expression profile distinct from that of late lesions, allowing us to segregate the patients into two groups. This finding suggests that 3 months would be an appropriate time to classify recent and late CL lesions. On the other hand, number and type of lesions were not associated with the gene expression profile of patients based on heat map analysis.

The susceptibility of mammalian hosts to intracellular pathogens is largely determined during the transition from innate to adaptive immunity (Fearon and Locksley, 1996; Luster, 2002). The local immunological milieu created at the initial stage of the host–pathogen interaction shapes adaptive cell-mediated immunity in subsequent development of disease or protective immunity (Luther and Cyster, 2001; Ward et al., 1998). In leishmaniasis, some

studies have also shown that polymorphisms that affect the expression or function of certain cytokines and chemokines may be associated with disease outcome. In this context, the -174bp G/C single nucleotide polymorphism in the promoter region of the gene encoding IL6 (*IL6*) have been associated with increased susceptibility to mucosal leishmaniasis caused by *L. braziliensis* infection (Castellucci et al., 2006). Furthermore, Ramasawmy et al. (2010) showed an association between the *CCL2* -2518bp G allele with high plasma and macrophage MCP-1 levels and susceptibility to mucosal leishmaniasis, but not CL disease caused by *L. braziliensis*. In the current study, we observed higher levels of IL10, TGF $\beta$ 1, IL4, TNF, IFNG, IL12B, CCL2, CCL3, CCL5, and CXCL10 in the recent CL lesion group compared with the late CL lesion group. In peripheral blood of CL patients infected with *L. braziliensis*, Baratta-Masini et al. (2007) showed that early lesions presented a greater number of IL4<sup>+</sup> and IL10<sup>+</sup> T cells compared with patients with older lesions. On the other hand, Melby et al. (1994) demonstrated greater expression of TNF, IL10, and TGF $\beta$ 1 transcripts in CL late lesions compared with CL early lesions. The patients evaluated by Melby et al. (1994) presented infection by *L. mexicana*, whereas our study evaluated patients infected with *L. braziliensis*. This variable could explain the different gene expression profile observed between the two studies. Also, some studies showed that chemokine induction after *Leishmania* infection was dependent on the parasite strain used (Racoosin and Beverley, 1997; Teixeira et al., 2005). Moreover, Campanelli et al. (2010) demonstrated a higher frequency of IL10-producing cells as well as TGF- $\beta$  in CL late lesions compared with early lesions. Differences between our study and Campanelli et al. (2010) may be related to the methodological approach, because they evaluated intracellular cytokine from T cells present in the lesions of patients with CL by flow cytometry. Thus, we found that the immune profile observed in this indigenous population showed differences from other studies in non-indigenous populations with CL.

Furthermore, the analysis of the cytokine and chemokine signatures revealed that the recent lesion group showed a mixed profile with inflammatory and modulatory events occurring simultaneously, mainly due to high levels of IL10, TGFB1, CCL3, CCL5, and CXCL10. This situation could be beneficial to the parasite through recruitment of host cells, which it can infect and survive within and thus proliferate (van Zandbergen et al., 2004). This suggests the distribution of cytokine is possibly highly dynamic, variable in space and time. Recent studies on the evolution of resistance demonstrate that variation of environmental stress, either in time or space, can accelerate the speed of evolution of resistance (Lee et al., 2010; Zhang et al., 2011).

Thus, our results revealed that in the early stages of the disease a favorable microenvironment exists for CL establishment and progression. In this context, in CL murine models, IL4 was shown to play a critical role in mediating susceptibility to *Leishmania* infection by down-regulating the expression of protective Th1-associated cytokines IL12 and IFN- $\gamma$ , inhibiting both nitric oxide production, and parasite killing by macrophages (Alexander et al., 1999). In addition, regulatory T cells (natural and induced) and their cytokines such as IL10 and TGF- $\beta$  are strongly associated with leishmanial disease and pathology and may render macrophages unresponsive in activating pathways induced by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Thus, although the function of regulatory T cells is to control immune-mediated pathology, in the case of leishmanial disease, they may contribute to macrophages' failure to kill parasites, which in turn would lead to sustained triggering of inflammatory responses and tissue destruction (Nylén and Eidsmo, 2012).

In the recent lesion group, we also observed increased expression of inflammatory cytokines (TNF, IFNG, IL12B) and chemokines (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10). This fact may be associated with both recruitment and activation of specific leukocyte subsets to the site of infection, as an attempt of the host to combat the disease. In both human and



experimental models of CL, control of infection is mediated by T lymphocytes and is critically dependent upon the early induction of an IL12-driven Th1-type immune response and the production of IFN- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> T cells. IFN- $\gamma$  plays a critical role in the activation of macrophages to kill intracellular parasites by inducing production of nitric oxide, which is essential for parasite elimination (Cummings et al., 2010). In this context, Ritter and Moll (2000) demonstrated that IFN- $\gamma$  acts with CCL2 to eliminate *L. major* from infected macrophages. Furthermore, TNF- $\alpha$  and IL1 $\beta$  together with CCL3 were reported to regulate Langerhans cell-mediated transport of *Leishmania* from the infected skin to regional lymph nodes in murine CL (Arnoldi and Moll, 1998). IL12 is required for the induction of Th1-related chemokines such as XCL1, CXCL10, and CCL2 in lymph nodes of resistant *L. major*-infected mice (Zaph and Scott, 2003). The administration of recombinant mouse CXCL10 to susceptible BALB/c mice significantly enhances NK cell cytotoxic activity and resistance against *L. major*, indicating that CXCL10 might contribute to promoting the development of a protective immune response (Vester et al., 1999). Treatment with Met-RANTES (a functional antagonist of CCR1 and CCR5) or anti-CCL5 rendered C57BL/6 mice more susceptible to *L. major*, skewing the immune response toward Th2 (Santiago et al., 2004).

Additionally, the correlation networks showed that there was an association between the evaluated genes, indicating that infection with *L. braziliensis* is characterized by changes in different biomarkers. In this context, this analysis showed connections between modulatory and inflammatory cytokines and chemokines, termed as a modulated inflammatory profile. Interestingly, we found that the cyclic structure, composed of IFNG, CXCL10, CCL2, and IL12B, observed in the topology of the network in response to *L. braziliensis* infection was preserved with the time evolution of the lesion and might be responsible for the network significance. Thus, we also observed in the subnetwork of the late lesion a modulated inflammatory profile represented by correlations between inflammatory cytokines and

chemokines and IL10. In this context, it seems that a predominant Th1 response is necessary for parasite control and lesion healing, whereas the concomitant presence of IL4 and IL10, and probably other modulatory cytokines such as TGF- $\beta$ , may contribute to parasite escape, sustenance of inflammatory stimulation, and lesion persistence (Melby et al., 1994; Rodrigues et al., 1998; Salhi et al., 2008).

This is one of the few studies that evaluated immunological aspects related to the development and maintenance of the CL in an indigenous population. In conclusion, our findings demonstrate that differential gene expression of cytokines and chemokines found in skin lesions from CL patients is associated with time evolution of the lesions.

### **Acknowledgements**

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities. OAMF, RS, MNM, CMFG, and ATC thank CNPq for fellowships (PQ).

---

**References**

- Alexander J., Satoskar A.R., Russell D.G., 1999. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112, 2993-3002.
- Ameen M., 2010. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol* 35, 699-705.
- Antoniazzi S., Price H.P., Kropf P., Freudenberg M.A., Galanos C., Smith D.F., Müller I., 2004. Chemokine gene expression in Toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with *Leishmania major*. *Infect Immun* 72, 5168-5174.
- Arnoldi J., Moll H., 1998. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Dev Immunol* 6, 3-11.
- Awasthi A., Mathur R.K., Saha B., 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 119, 238-258.
- Baratta-Masini A., Teixeira-Carvalho A., Malaquias L.C., Mayrink W., Martins-Filho O.A., Corrêa-Oliveira R., 2007. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Front Biosci* 12, 839-849.
- Bittencourt A.L., Barral A., 1991. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86, 51-56. Erratum in: *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86, following 378.
- Bomfim G., Andrade B.B., Santos S., Clarêncio J., Barral-Netto M., Barral A., 2007. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *Am J Trop Med Hyg* 77, 854-859.
- Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2007. Relatório interno da Unidade Regional de Montes Claros [in Portuguese] [s.l.]: [s.n.].
- Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Sistema de Informações da Atenção à Saúde Indígena (SIASI): Demografia dos Povos Indígenas [in Portuguese]. Available: <http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb>. Accessed 21 December 2012.
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, 2007. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana [in Portuguese] 2nd Edition. Brasília, DF. Available: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_lta\\_2ed.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf). Accessed 21 December 2012.
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial [in Portuguese]. Brasília, DF. Available: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/atlas\\_lta.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/atlas_lta.pdf). Accessed 26 February 2013.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611-622.
- Cáceres-Dittmar G., Tapia F.J., Sánchez M.A., Yamamura M., Uyemura K., Modlin R.L., Bloom B.R., Convit J., 1993. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 91, 500-505.

- Campanelli A.P., Brodskyn C.I., Boaventura V., Silva C., Roselino A.M., Costa J., Saldanha A.C., de Freitas L.A., de Oliveira C.I., Barral-Netto M., Silva J.S., Barral A., 2010. Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. *Hum Immunol* 71, 1220-1227.
- Campi-Azevedo A.C., de Araújo-Porto L.P., Luiza-Silva M., Batista M.A., Martins M.A., Sathler-Avelar R., da Silveira-Lemos D., Camacho L.A., de Menezes Martins R., de Lourdes de Sousa Maia M., Farias R.H., da Silva Freire M., Galler R., Homma A., Ribeiro J.G., Lemos J.A., Auxiliadora-Martins M., Caldas I.R., Elói-Santos S.M., Teixeira-Carvalho A., Martins-Filho O.A., 2012. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. *PLoS One* 7, e49828.
- Castellano L.R., Filho D.C., Argiro L., Dessen H., Prata A., Dessen A., Rodrigues V., 2009. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol* 70, 383-390.
- Castellucci L., Menezes E., Oliveira J., Magalhaes A., Guimaraes L.H., Lessa M., Ribeiro S., Reale J., Noronha E.F., Wilson M.E., Duggal P., Beaty T.H., Jeronimo S., Jamieson S.E., Bales A., Blackwell J.M., de Jesus A.R., Carvalho E.M., 2006. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis* 194, 519-527.
- Chong B.F., Wilson A.J., Gibson H.M., Hafner M.S., Luo Y., Hedgcock C.J., Wong H.K., 2008. Immune function abnormalities in peripheral blood mononuclear cell cytokine expression differentiates stages of cutaneous T-cell lymphoma/mycosis fungoides. *Clin Cancer Res* 14, 646-653.
- Cummings H.E., Tuladhar R., Satoskar A.R., 2010. Cytokines and their STATs in cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Biomed Biotechnol* 2010, 294389.
- Cupolillo E., Grimaldi G. Jr., Momen H., 2004. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 50, 296-311.
- De Carneri I., Nuttels N., Miranda J.A., 1963. Epidemic of cutaneous leishmaniasis among the Waur'a indians of the Xingu National Park (state of Mato Grosso, Brazil) [in Portuguese]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 5, 271-272.
- de Magalhães A.V., Chiarini L.H., Raick A.N., 1982. The histopathology of cutaneous leishmaniasis [in Portuguese]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 24, 268-276.
- de Magalhães A.V., Moraes M.A., Raick A.N., Llanos-Cuentas A., Costa J.M., Cuba C.C., Marsden P.D., 1986a. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions [in Portuguese]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 28, 253-262.
- Dhanasekaran S., Doherty T.M, Kenneth J., TB Trials Study Group, 2010. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J Immunol Methods* 354, 34-39.
- Fearon D.T., Locksley R.M., 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-53.
- Ferro C., Marín D., Góngora R., Carrasquilla M.C., Trujillo J.E., Rueda N.K., Marín J., Valderrama-Ardila C., Alexander N., Pérez M., Munstermann L.E., Ocampo C.B., 2011. Phlebotomine vector ecology in the domestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in Chaparral, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 85, 847-856. Erratum in: *Am J Trop Med Hyg* 85, 1154.

- Forattini O.P., Dos Santos M., 1956. Note on a focus of American cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso, Brazil [in Portuguese]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* 8, 127-133.
- Fukushima A., Kusano M., Redestig H., Arita M., Saito K., 2011. Metabolomic correlation-network modules in *Arabidopsis* based on a graph-clustering approach. *BMC Syst Biol* 5, 1.
- Garcia L., Kindt A., Bermudez H., Llanos-Cuentas A., De Doncker S., Arevalo J., Wilber Quispe Tintaya K., Dujardin J.C., 2004. Culture-independent species typing of Neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 42, 2294-2297.
- Giudice A., Vendrame C., Bezerra C., Carvalho L.P., Delavechia T., Carvalho E.M., Bacellar O., 2012. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis* 12, 75.
- Goto H., Lindoso J.A., 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8, 419-433.
- Guimarães L.H., Machado P.R., Lago E.L., Morgan D.J., Schriefer A., Bacellar O., Carvalho E.M., 2009. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103, 712-715.
- Hejazi S.H., Hoseini S., Javanmard S.H., Zarkesh S.H., Khamesipour A., 2012. Interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$  in early and late lesions of patients with *Leishmania major* induced cutaneous leishmaniasis. *Iran J Parasitol* 7, 16-23.
- Jara M., Adauí V., Valencia B.M., Martínez D., Alba M., Castrillon C., Cruz M., Cruz I., Van der Auwera G., Llanos-Cuentas A., Dujardin J.C., Arevalo J., 2013. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol* 51, 1826-1833.
- Ji J., Sun J., Soong L., 2003. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* 71, 4278-4288.
- Katzman S.D., Fowell D.J., 2008. Pathogen-imposed skewing of mouse chemokine and cytokine expression at the infected tissue site. *J Clin Invest* 118, 801-811.
- Langfelder P., Horvath S., 2012. Fast R Functions for Robust Correlations and Hierarchical Clustering. *J Stat Softw* 46(11), i11.
- Lee H.H., Molla M.N., Cantor C.R., Collins J.J., 2010. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 467(7311):82-85.
- Lin Z.Y., Chuang W.L., 2010. Pharmacologic concentrations of ascorbic acid cause diverse influence on differential expressions of angiogenic chemokine genes in different hepatocellular carcinoma cell lines. *Biomed Pharmacother* 64, 348-351.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C(T)$ ). *Method Methods* 25, 402-408.
- Luiza-Silva M., Martins M.A., Espírito-Santo L.R., Campi-Azevedo A.C., Silveira-Lemos D., Ribeiro J.G., Homma A., Kroon E.G., Teixeira-Carvalho A., Elói-Santos S.M., Martins-Filho O.A., 2011a. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine* 29, 583-592.
- Luster A.D., 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 14, 129-135.

- Luther S.A., Cyster J.G., 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2, 102-107.
- Matte C., Olivier M., 2002. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *J Infect Dis* 185, 673-681.
- Melby P.C., Andrade-Narvaez F.J., Darnell B.J., Valencia-Pacheco G., Tryon V.V., Palomo-Cetina A., 1994. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62, 837-842.
- Montenegro J., 1924. Anatomopatologia da leishmaniose cutânea [in Portuguese]. *An Paul Med Cir* 15, 5-11.
- Müller K., van Zandbergen G., Hansen B., Laufs H., Jahnke N., Solbach W., Laskay T., 2001. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 190, 73-76.
- Murray H.W., Berman J.D., Davies C.R., Saravia N.G., 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.
- Musso O., Sommer P., Drouet E., Cotte L., Neyra M., Grimaud J.A., Chevallier M. 1996. In situ detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. *J Virol Methods* 56, 125-137.
- Nylén S., Eidsmo L., 2012. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 34, 551-561.
- Overbergh L., Giulietti A., Valckx D., Decallonne R., Bouillon R., Mathieu C., 2003. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech* 14, 33-43.
- Pena J.L., Heller L., 2008. Environmental sanitation and Indian health: an assessment on the Xakriabá population, Minas Gerais [in Portuguese]. *Eng Sanit Ambient* 13, 63-72.
- Pirmez C., Yamamura M., Uyemura K., Paes-Oliveira M., Conceição-Silva F., Modlin R.L., 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91, 1390-1395.
- Quaresma P.F., Rêgo F.D., Botelho H.A., da Silva S.R., Moura Júnior A.J., Teixeira Neto R.G., Madeira F.M., Carvalho M.B., Paglia A.P., Melo M.N., Gontijo C.M., 2011. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105, 579-585.
- R Development Core Team, 2011. R: A language and environment for statistical computing, reference index version 2.13.0. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Racoosin E.L., Beverley S.M., 1997. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp Parasitol* 85, 283-295.
- Ramasawmy R., Menezes E., Magalhães A., Oliveira J., Castellucci L., Almeida R., Rosa M.E., Guimarães L.H., Lessa M., Noronha E., Wilson M.E., Jamieson S.E., Kalil J., Blackwell J.M., Carvalho E.M., de Jesus A.R., 2010. The -2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol* 10, 607-613.
- Reithinger R., Dujardin J.C., Louzir H., Pirmez C., Alexander B., Brooker S., 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7, 581-596.
- Ritter U., Körner H., 2002. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 24, 295-301.

- Ritter U., Moll H., 2000. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *Eur J Immunol* 30, 3111-3120.
- Ritter U., Moll H., Laskay T., Bröcker E., Velazco O., Becker I., Gillitzer R., 1996. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis* 173, 699-709.
- Rodrigues V. Jr., Santana da Silva J., Campos-Neto A., 1998. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66, 1233-1236.
- Salhi A., Rodrigues V. Jr., Santoro F., Dessein H., Romano A., Castellano L.R., Sertorio M., Rafati S., Chevillard C., Prata A., Alcaïs A., Argiro L., Dessein A., 2008. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* 180, 6139-6148.
- Santiago H.C., Oliveira C.F., Santiago L., Ferraz F.O., de Souza D.G., de-Freitas L.A., Afonso L.C., Teixeira M.M., Gazzinelli R.T., Vieira L.Q., 2004. Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. *Infect Immun* 72, 4918-4923.
- Teixeira M.J., Fernandes J.D., Teixeira C.R., Andrade B.B., Pompeu M.L., Santana da Silva J., Brodskyn C.I., Barral-Netto M., Barral A., 2005. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun* 73, 1191-1195.
- Teixeira M.J., Teixeira C.R., Andrade B.B., Barral-Netto M., Barral A., 2006. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 22, 32-40.
- Toki S., Kagaya S., Shinohara M., Wakiguchi H., Matsumoto T., Takahata Y., Morimatsu F., Saito H., Matsumoto K., 2009. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus casei* suppress *Escherichia coli*-induced chemokine expression in intestinal epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 148, 45-58.
- van Zandbergen G., Klinger M., Mueller A., Dannenberg S., Gebert A., Solbach W., Laskay T., 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173, 6521-6525.
- Vester B., Müller K., Solbach W., Laskay T., 1999. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun* 67, 3155-3159.
- Ward S.G., Bacon K., Westwick J., 1998. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* 9, 1-11.
- WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Available: [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html) . Accessed 31 January 2013.
- Zaph C., Scott P., 2003. Interleukin-12 regulates chemokine gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. *Infect Immun* 71, 1587-1589.
- Zhang Q., Lambert G., Liao D., Kim H., Robin K., Tung C.K., Pourmand N., Austin R.H., 2011. Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments. *Science* 333, 1764-1767.
- Zhang Z., Bryan J.L., DeLassus E., Chang L.W., Liao W., Sandell L.J. 2010. CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  and NF- $\kappa$ B mediate high level expression of chemokine genes CCL3 and CCL4 by human chondrocytes in response to IL-1 $\beta$ . *J Biol Chem* 285, 33092-33103.

## Figure legends

**Figure 1. Histopathological analysis of skin tissue samples.** The samples were collected from indigenous patients with CL (C to H) and the control group (A and B). Panels A and B show hyperkeratosis and focal hyperplasia of basal keratinocytes, absence of inflammatory infiltrate. C and D show mild hyperkeratosis and exudative reaction with mild mononuclear inflammatory infiltrate composed predominantly of lymphocytes and plasma cells. E and F show exudative reaction characterized by focal necrosis and moderate mixed inflammatory infiltrate rich in lymphocytes, plasma cells, and histiocytes. G and H show exudative and necrotic granulomatous reaction characterized by intense mixed inflammatory infiltrate rich in lymphocytes, plasma cells, and histiocytes; note the presence of multinucleated giant cells (short arrow) and intracellular amastigotes (long arrow). Left panel: hematoxylin and eosin 20×; right panel: hematoxylin and eosin 63×.

**Figure 2. Heat map and hierarchical cluster representation of genes expressed in indigenous CL patients.** The relative expression was represented by  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and the data plotted were converted to Z-scores. The patients were stratified by type (gray represents typical and blue represents atypical), time (cyan represents recent and magenta represents late), and number of lesions (orange represents one lesion and purple represents more than one lesion).

**Figure 3. Gene expression profile in skin tissues according to time of lesion.** Relative transcript levels of modulatory (IL10 and TGFB1), anti-inflammatory (IL4), and pro-inflammatory (TNF, IFNG, IL12B, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10) cytokines and chemokines in inflammatory infiltrate of recent (light gray bar,  $n = 9$ ) and late (dark gray bar,  $n = 9$ ) lesions of indigenous CL patients. The results are presented in a column chart format and are expressed as the median  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  and interquartile range. Statistical differences between recent and late lesion groups were considered significant when  $p < 0.05$ .

**Figure 4. Analysis of relative gene expression signature of cytokines and chemokines according to time of lesion.** Overall pattern of relative gene expression of IL10, TGFB1, IL4, TNF, IFNG,



IL12B, CCL2, CCL3, CCL5, and CXCL10 in inflammatory infiltrate of recent and late lesions of indigenous CL patients. The pattern of modulatory/anti-inflammatory (gray bar) and inflammatory (black bar) is presented as the ascendant percentages of indigenous patients with high mRNA expression of evaluated genes. Comparative analysis of the overall cytokines and chemokines between recent (lines with squares) or late (lines with triangles) lesions were further performed by overlapping the ascendant cytokine and chemokine curves (bottom panel). Dotted lines highlight the 25th, 50th and 75th percentiles used as reference for comparative analysis. \*Relevant differences were considered when the frequency for a given cytokine or chemokine emerged outside the 50th percentile as compared with the reference cytokine or chemokine pattern or signature.

**Figure 5. Correlation network of genes expressed in *Leishmania*-infected patients.** (A) Network of gene response to *L. braziliensis* infection. (B) Subnetwork identified in patients with late lesions. Correlation between two genes was calculated by Spearman's test. *p*-values were calculated by number of times that a network is found in 1000 random evaluations with the same number of vertices. The gray vertices represent modulatory cytokines and black represent inflammatory cytokines and chemokines. The edges represent positive correlations between two genes.

**Table 1.** Characterization of the studied population and histopathology

STUDY POPULATION						HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS							
Individuals evaluated	Age (years)	Gender	Time of lesion (months)	Number of lesions	Type of lesion	*PMN cells	*MONO cells	*Plasma cells	†Granulomas	†Necrosis	†Fibrosis	†Parasite	‡Classification
CT 01	15	Male	----	----	----	0	0	0	0	0	1	0	0
CT 02	36	Female	----	----	----	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
CT 03	39	Male	----	----	----	0	1	0	0	0	1	0	0
CT 04	61	Male	----	----	----	0	1	0	0	0	1	0	0
CT 05	72	Female	----	----	----	0	1	0	0	0	0	0	0
CL 01	08	Female	03	01	Atypical	1	3	3	0	1	0	1	III
CL 02	09	Male	06	01	Atypical	0	2	2	0	1	1	1	II
CL 03	10	Female	12	02	Atypical	0	1	2	0	0	0	1	I
CL 04	14	Male	49	01	Typical	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
CL 05	19	Male	02	02	Typical	1	2	3	0	1	0	1	II
CL 06	20	Male	24	02	Atypical	0	2	2	1	1	0	1	II
CL 07	20	Male	02	01	Atypical	1	2	2	0	0	0	1	I
CL 08	21	Male	02	01	Typical	0	2	1	0	0	0	1	I
CL 09	22	Female	01	01	Atypical	0	2	2	0	0	0	1	I
CL 10	29	Female	03	06	Atypical	0	1	0	0	0	0	0	I
CL 11	29	Male	12	01	Typical	0	1	2	0	0	1	0	I
CL 12	31	Female	42	03	Atypical	0	2	1	0	0	0	1	I
CL 13	33	Female	04	04	Atypical	1	2	2	0	1	0	1	II
CL 14	37	Male	03	01	Typical	1	3	3	1	1	0	1	III
CL 15	39	Male	04	09	Typical	1	2	2	0	1	1	1	II
CL 16	41	Male	36	01	Typical	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
CL 17	46	Male	01	01	Typical	0	1	0	0	0	0	0	I
CL 18	73	Male	03	01	Atypical	1	1	2	0	0	0	1	I

\*Negative or absent - 0; Light - 1; Moderate - 2; Accentuated - 3. †Negative or absent - 0; Positive or presence - 1. ‡de Magalhães et al., (1986a): Not classifiable - 0; Cellular exsudative reaction - I; Necrotic and exsudative reaction - II; Exsudative and necrotic granulomatous reaction - III.

Abbreviations: CT - Individuals used as control; CL - Indigenous patients with cutaneous leishmaniasis. PMN - Polymorphonuclear; MONO - Mononuclear. NP - Not performed.

**Table 2.** Sequences of primers used for quantification of mRNA expression by RT-qPCR

GENE	PRIMER SEQUENCE (5'- 3')	GENBANK ACCESSION	PRODUCT LENGTH	PRIMER CONCENTRATION	cDNA VOLUME	MELTING TEMPERATURE	REACTION EFFICIENCY	R <sup>2</sup>	REFERENCE
ACTB	FW: ACCTCATGAAGATCCTCACC RV: CCATCTCTTGCTCGAAGTCC	AY582799.1	120bp	FW: 0.6µM RV: 0.6µM	1.0µL	60.0 °C	98.1%	0.989	(Musso et al., 1996)
IL10	FW: GTGATGCCCAAGCTGAGA RV: CACGGCCTTGCTCTTGTTTT	U16720.1	138bp	FW: 2.0µM RV: 2.0µM	1.0µL	60.0 °C	96.1%	0.998	(Overbergh et al., 2003)
TGFB1	FW: CAGCAACAATTCCTGGCGATA RV: AAGGCGAAAGCCCTCAATTT	NM_000660.4	136bp	FW: 2.0µM RV: 2.0µM	1.0µL	60.0 °C	96.8%	0.999	(Overbergh et al., 2003)
IL4	FW: CACAGGCACAAGCAGCTGAT RV: CTCTGGTTGGCTTCCTTCA	M23442.1	101bp	FW: 0.9µM RV: 0.9µM	2.0µL	60.0 °C	97.5%	1.000	(Chong et al., 2008)
TNF	FW: TCTTCTCGAACCCCGAGTGA RV: CCTCTGATGGCACCACCAG	X02910.1	151bp	FW: 1.0µM RV: 1.0µM	1.0µL	62.0 °C	98.2%	0.985	(Overbergh et al., 2003)
IFNG	FW: TTCAGCTCTGCATCGTTTTG RV: TCCGCTACATCTGAATGACCT	NM_000619 NG_015840.1	112bp	FW: 1.0µM RV: 1.0µM	1.0µL	60.0 °C	97.5%	0.976	(Dhanasekaran et al., 2010)
IL12B	FW: TGGAGTGCCAGGAGGACAGT RV: TCTTGGGTGGGTCAGGTTTG	NM_002187.2 NG_009618.1	147bp	FW: 1.0µM RV: 1.5µM	1.0µL	62.0 °C	96.2%	0.995	(Overbergh et al., 2003)
CCL2	FW: AGTCTCTGCCGCCCTTCT RV: GTGACTGGGGCATTGATTG	M37719.1	93bp	FW: 1.0µM RV: 1.0µM	1.0µL	60.0 °C	99.3%	0.997	(Lin and Chuang, 2010)
CCL3	FW: GCAACCAGTTCTCTGCATCA RV: TGGCTGCTCGTCTCAAAGTA	D90144.1	140bp	FW: 1.0µM RV: 1.0µM	1.0µL	60.0 °C	98.1%	0.990	(Zhang et al., 2010)
CCL5	FW: CAGCCCTCGCTGTCATCCTCA RV: TTGGCGGTTCTTTCGGGTGAC	DQ017060.1	197bp	FW: 0.1µM RV: 0.1µM	1.0µL	60.0 °C	99.1%	0.984	Designed
CXCL10	FW:GCCAATTTTGTCCACGTGTTG RV: AGCCTCTGTGTGGTCCATCCT	NM_001565.3	193bp	FW: 1.0µM RV: 1.0µM	1.0µL	60.0 °C	93.0%	0.999	(Toki et al., 2009)

GenBank accession number of the sequence used to selection/design primers and their product length are shown, as well as each primer concentration, cDNA volume, melting temperature, PCR efficiency, R<sup>2</sup> and reference.

Abbreviations: FW - Forward primer; RV - Reverse primer.

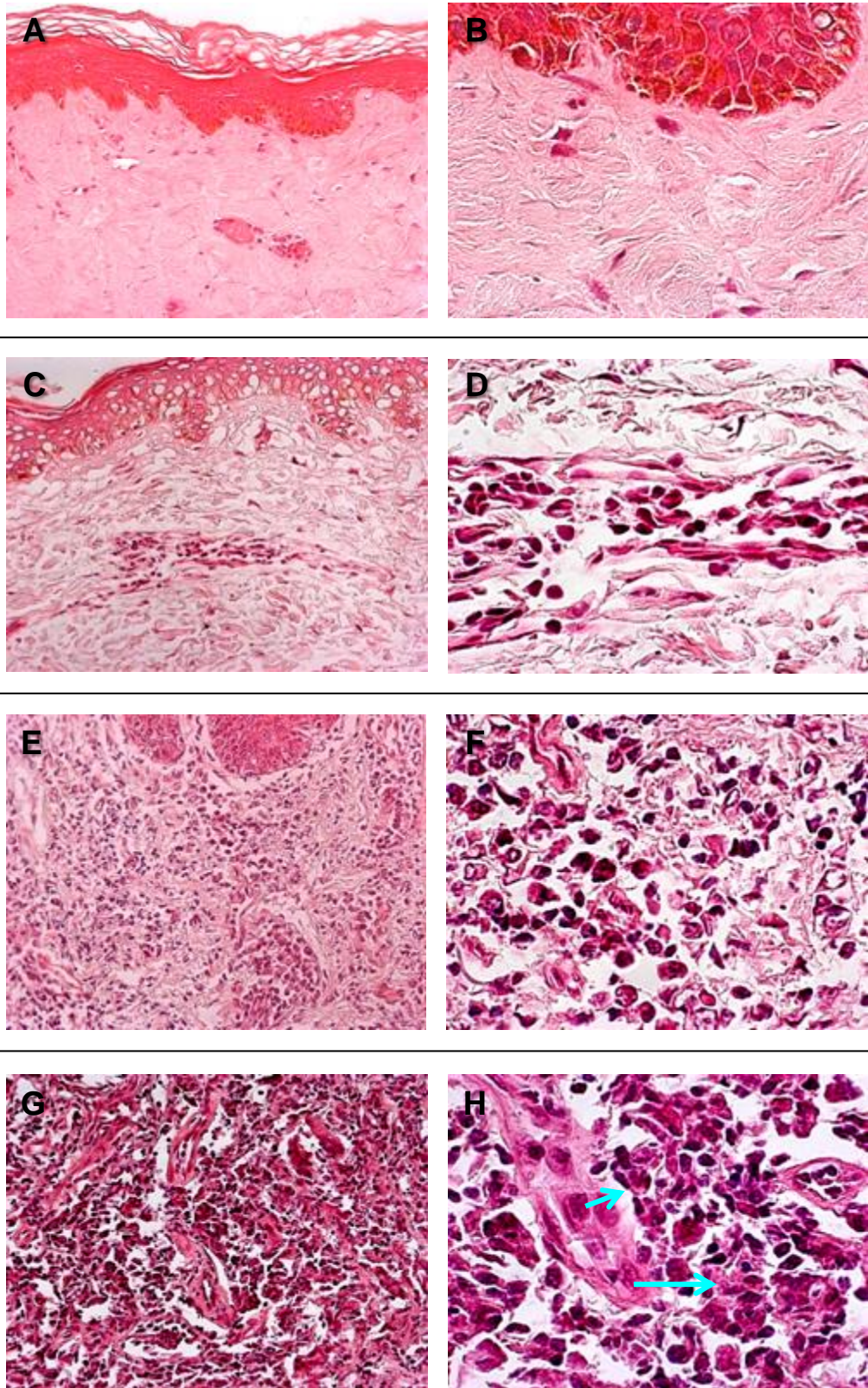


Figure 1

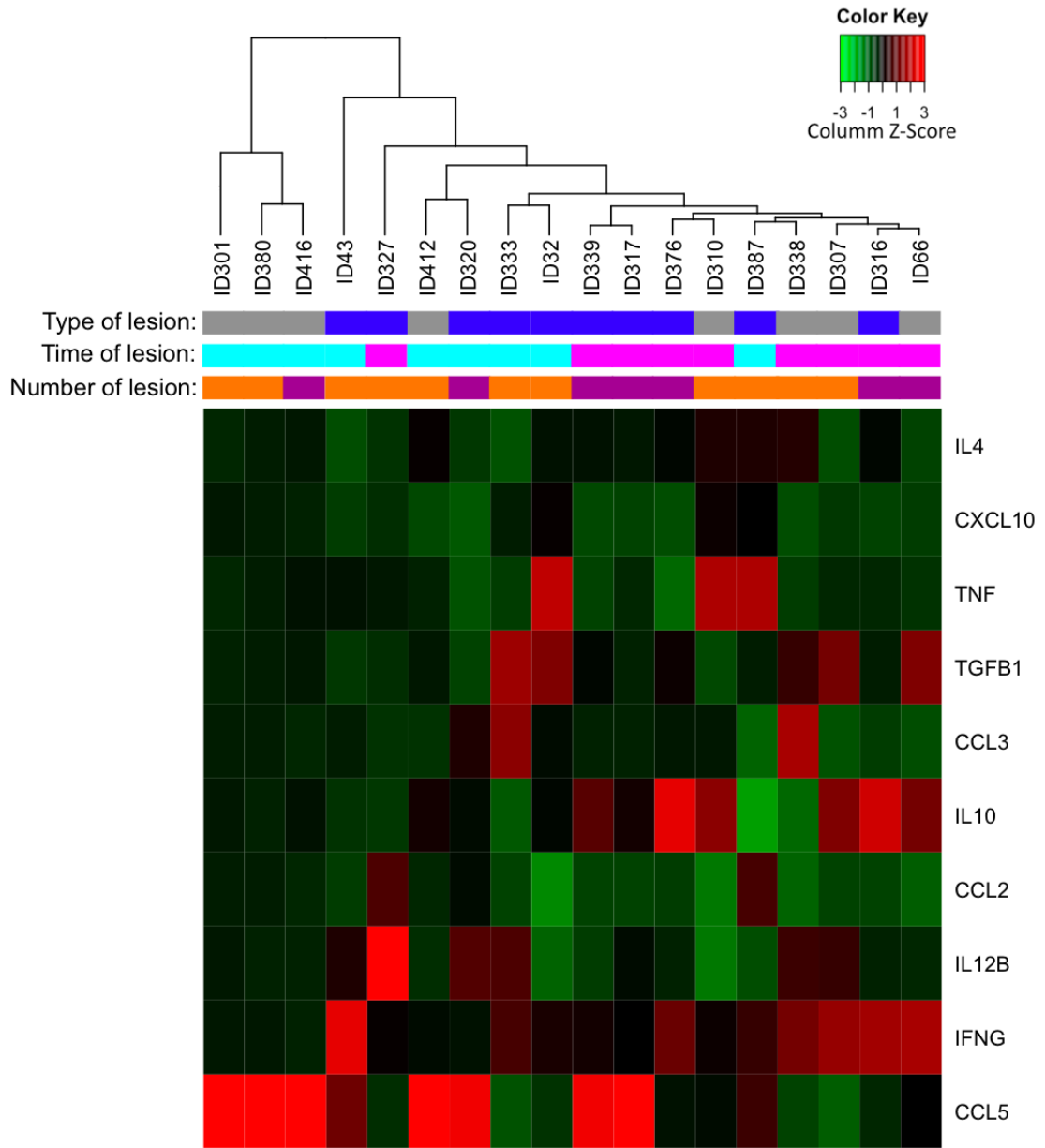


Figure 2

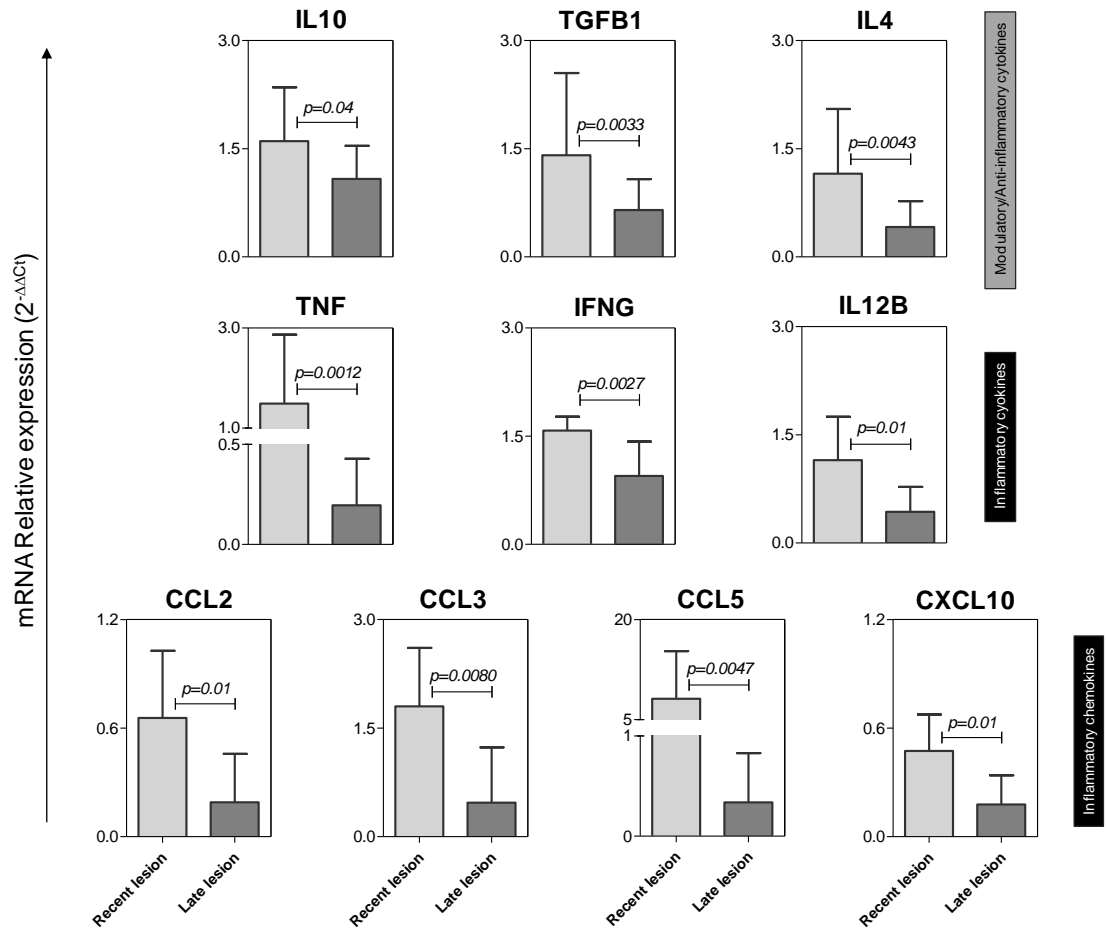


Figure 3

Overall Pattern of Modulatory/anti-inflammatory/inflammatory cytokines and chemokines

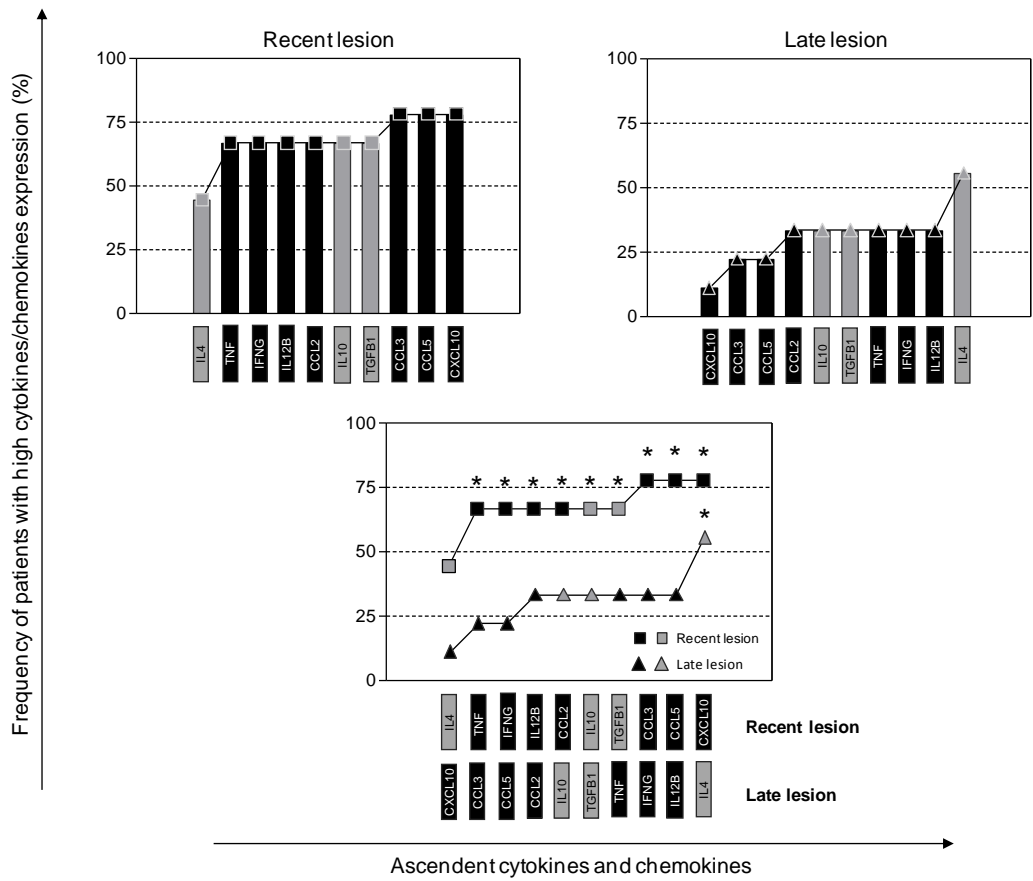


Figure 4

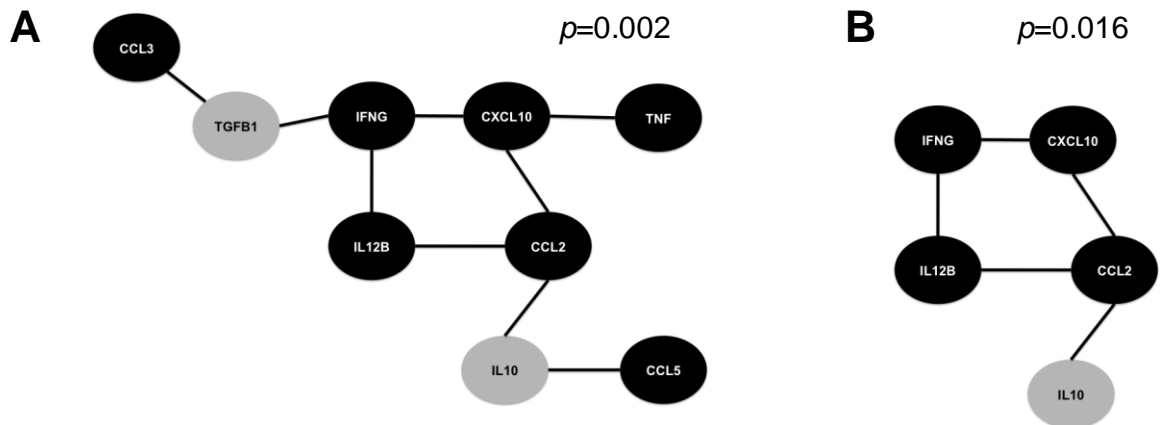


Figure 5





- Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1522-1525.
- Ajdary S, Ghamilouie MM, Alimohammadian MH, Riazi-Rad F, Pakzad SR. Toll-like receptor 4 polymorphisms predispose to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect.* 2011; 13: 226-231.
- Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol.* 2010; 35: 699-705.
- Anderson CF, Mendez S, Sacks DL. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2005; 174: 2934-2941.
- Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol.* 2002; 72:101-106.
- Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* 2005; 101: 226-230.
- Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol.* 2004; 136: 341-348.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000; 25: 187-191.
- Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res.* 2004; 119: 238-258.
- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, Carvalho EM. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2009; 200: 75-78.
- Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002; 70: 6734-6740.
- Bacha HA, Tuon FF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, Oliveira J, Nicodemo AC, Quiroga MM, Mascheretti M, Boulos M, Amato VS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105: 173-178.
- Balaña-Fouce R, Calvo-Álvarez E, Álvarez-Velilla R, Prada CF, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 2012; 181: 85-93.
- Baratta-Masini A. Estudo da Resposta Imune Celular de Indivíduos residentes em área endêmica para a Leishmaniose Tegumentar. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG - Belo Horizonte, 2006.

- Baratta-Masini A, Carvalho AT, Malaquias LCC, Mayrink W, Martins Filho OA, Corrêa-Oliveira R, Oliveira RC. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Frontiers in Bioscience*. 2007; 12: 839-849.
- Barksdale AR, Bernard AC, Maley ME, Gellin GL, Kearney PA, Boulanger BR, Tsuei BJ, Ochoa JB. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. *Surgery*. 2004; 135: 527-535.
- Barral A, Jesus AR, Almeida RP et al. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 1987; 9: 487-497.
- Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996; 334: 1717-1725. Review.
- Belkaid Y, Butcher B, Sacks DL. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol*. 1998; 28: 1389-1400.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002; 420: 502-507.
- Berg DJ, Leach MW, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Davidson NJ, Rennick D. Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med*. 1995; 182: 99-108.
- Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis*. 1988; 10: 560-586. Review.
- Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*. 2006 ;24: 353-389. Review.
- Bhattacharyya S, Ghosh S, Dasgupta B, Mazumder D, Roy S, Majumdar S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J Infect Dis*. 2002; 185: 1704-1708.
- Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102: 625-630.
- Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991; 86: 51-56. Erratum in: *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: following 378.
- Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991; 86: 51-56. Erratum in: *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: following 378.

- Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Barral A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol.* 2010; 40: 2830-2836.
- Bomfim G, Andrade BB, Santos S, Clarêncio J, Barral-Netto M, Barral A. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77: 854-859.
- Bosque F, Saravia NG, Valderrama L, Milon G. Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scand J Immunol.* 2000; 51: 533-541.
- Bourreau E, Prévot G, Gardon J, Pradinaud R, Launois P. High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. *J Infect Dis.* 2001; 184: 1628-1630.
- Brandonisio O, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, Acquafredda A, Spinelli R, Mitolo V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clin Exp Med.* 2002; 2: 125-129.
- Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2007. Relatório interno da Unidade Regional de Montes Claros [s.l.]: [s.n.].
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, 2007. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana, 2a. Edição. Brasília, DF. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_lta\\_2ed.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf). Acessado em 20 de Julho de 2013.
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. Brasília, DF. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/atlas\\_lta.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/atlas_lta.pdf). Acessado em 20 de Julho de 2013.
- Brasil, Ministério da Saúde, Datasus, Sinan Net. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>. Acessado em 01 de Setembro 2013.
- Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2013. Sistema de informação de Agravos de Notificação, Relatório de Consulta [s.l.]: [s.n.].
- Brelaz MC, de Oliveira AP, de Almeida AF, de Assis Souza M, Medeiros ÂC, de Brito ME, Pereira VR. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. *Parasite Immunol.* 2012; 34: 236-239.
- Brittingham A, Chen G, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun.* 1999; 67: 4477-4484.

- Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 1995; 182: 1259-1264.
- Calegari-Silva TC, Pereira RM, De-Melo LD, Saraiva EM, Soares DC, Bellio M, Lopes UG. NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol Lett*. 2009; 127: 19-26.
- Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa MD, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão Filho SP. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res*. 2011; 108: 671-677.
- Campanelli AP, Brodskyn CI, Boaventura V, Silva C, Roselino AM, Costa J, Saldanha AC, de Freitas LA, de Oliveira CI, Barral-Netto M, Silva JS, Barral A. Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. *Hum Immunol*. 2010; 71: 1220-1227.
- Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, Goncalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva JS. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis*. 2006; 193: 1313-1322.
- Campi-Azevedo AC, de Araújo-Porto LP, Luiza-Silva M, Batista MA, Martins MA, Sathler-Avelar R, da Silveira-Lemos D, Camacho LA, de Menezes Martins R, de Lourdes de Sousa Maia M, Farias RH, da Silva Freire M, Galler R, Homma A, Ribeiro JG, Lemos JA, Auxiliadora-Martins M, Caldas IR, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. *PLoS One*. 2012; 7: e49828.
- Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks DL. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med*. 1996; 183: 515-526.
- Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 1994a; 152: 5949-5956.
- Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 1994; 56: 315-325.
- Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53: 273-277.
- Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado P, de Jesus AR. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol*. 2007; 29: 251-258.
- Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol*. 2012; 3: 301.

- Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A, Rodrigues V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol.* 2009; 70: 383-90.
- Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M, Ribeiro S, Reale J, Noronha EF, Wilson ME, Duggal P, Beaty TH, Jeronimo S, Jamieson SE, Bales A, Blackwell JM, de Jesus AR, Carvalho EM. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis.* 2006; 194: 519-527.
- 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.
- Chatelain R, Mauze S, Coffman RL. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunol.* 1999a; 21: 211-218.
- Chong BF, Wilson AJ, Gibson HM, Hafner MS, Luo Y, Hedgcock CJ, Wong HK. Immune function abnormalities in peripheral blood mononuclear cell cytokine expression differentiates stages of cutaneous T-cell lymphoma/mycosis fungoides. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 646-653.
- Colmenares M, Constant SL, Kima PE, McMahon-Pratt D. *Leishmania pifanoi* pathogenesis: selective lack of a local cutaneous response in the absence of circulating antibody. *Infect Immun.* 2002; 70: 6597-6605.
- Convit J, Pinaridi ME. Cutaneous leishmaniasis; the clinical and immunopathological spectrum in South America. *CIBA Foundation Symposium.* 1974; 20: 159-169.
- Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, Rondón AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993; 87: 444-448.
- Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg.* 1986; 89: 319-323.
- Costa JML, Netto EM, Vale KC, Osaki NK, Tada MS, Marsden PD. Spontaneous healing of cutaneous *Leishmania braziliensis braziliensis* ulcers. *Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1987; 81: 606.
- Costa-Silva MF, Gomes LI, Martins-Filho OA, Rodrigues-Silva R, Freire Jde M, Quaresma PF, Pascoal-Xavier MA, Mendes TA, Serakides R, Zauli DA, Campi-Azevedo AC, Melo MN, Gontijo CM, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A. Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. *Mol Immunol.* 2014; 57: 74-85.
- Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998; 31: 139-142.

- Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonça SC, Bertho AL, Soong L, McMahon-Pratt D. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol*. 1996; 84: 144-155.
- Cummings HE, Tuladhar R, Satoskar AR. Cytokines and their STATs in cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010: 294389. Review.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 50: 296-311.
- da Silva RP, Hall BF, Joiner KA, Sacks DL. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol*. 1989; 143: 617-622.
- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG. 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.
- Da-Cruz AM, Conceição-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.
- Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996; 91: 225-229.
- David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*. 2009; 22: 491-502.
- Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Pyke SDM, Dye C. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. *Epidemiol Infect*. 1995; 114: 297-318.
- de Almeida Ferreira S, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, Fujiwara RT, de Andrade AS, Melo MN. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6: e1596.
- de Carneri I, Nuttels N, Miranda JA. Epidemic of Cutaneous Leishmaniasis among the Waur'a Indians of the Xingu National Park (State of Mato Grosso, Brazil). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1963; 10: 271-272.
- de Magalhães AV, Chiarini LH, Raick AN. [The histopathology of cutaneous leishmaniasis]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1982; 24: 268-276. Portuguese.
- de Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, Marsden PD. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986a; 28: 253-262.

- de Souza Leao S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci.* 1995; 108: 3219-3231.
- de Souza MA, da Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto SJ, Ferreira MS. [Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in American tegumentary leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38: 137-141.
- de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol.* 2003; 33: 2822-2831.
- de-Campos SN, Souza-Lemos C, Teva A, Porrozzi R, Grimaldi G Jr. Systemic and compartmentalised immune responses in a *Leishmania braziliensis*-macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 137: 149-154.
- Delespesse G, Suter U, Mossalayi D, Bettler B, Sarfati M, Hofstetter H, Kilcherr E, Debre P, Dalloul A. Expression, structure, and function of the CD23 antigen. *Adv Immunol.* 1991; 49: 149-191. Review.
- Dhanasekaran S, Doherty TM, Kenneth J; TB Trials Study Group. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J Immunol Methods.* 2010; 354: 34-39.
- Dias M, Mayrink W, Deane LM, Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Batista SM, Araújo FG, Coelho MV, Williams P. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana. I. Estudo de reservatórios em área endêmica no estado de Minas Gerais. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1977; 19: 403-410.
- Díaz NL, Fernández M, Figueira E, Ramírez R, Monsalve IB, Tapia FJ. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2003; 28: 288-293.
- Domínguez M, Moreno I, Aizpurua C, Toraño A. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes Infect.* 2003; 5: 507-513. Review.
- Domínguez M, Moreno I, López-Trascasa M, Toraño A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J Exp Med.* 2002; 195: 451-459.
- Dugas B, Mossalayi MD, Damais C, Kolb JP. Nitric oxide production by human monocytes: evidence for a role of CD23. *Immunol Today.* 1995; 16: 574-580. Review.
- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun.* 2005; 73: 7853-7859.
- Faria MS, Reis FC, Lima AP. Toll-like receptors in *Leishmania* infections: guardians or promoters? *J Parasitol Res.* 2012; 2012: 930257.
- Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 1996; 272: 50-53. Review.

- Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur J Immunol*. 2006; 36: 411-420.
- Fleming BD, Mosser DM. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur J Immunol*. 2011; 41: 2498-2502. Review.
- Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 54-58.
- Forattini OP, dos Santos M. Note on a focus of American cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 1956; 8: 127-133.
- Freitas-Teixeira PM, Silveira-Lemos D, Giunchetti RC, Baratta-Masini A, Mayrink W, Peruhype-Magalhães V, Rocha RD, Campi-Azevedo AC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Distinct pattern of immunophenotypic features of innate and adaptive immunity as a putative signature of clinical and laboratorial status of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol*. 2012; 76: 421-432.
- Fundação Nacional de Saúde, FUNASA. Quantitativo de pessoas. Disponível em: [http://sis.funasa.gov.br/transparencia\\_publica/siasiweb/Layout/quantitativo\\_de\\_pessoas\\_2010.asp](http://sis.funasa.gov.br/transparencia_publica/siasiweb/Layout/quantitativo_de_pessoas_2010.asp). Acessado em 05 de agosto de 2013.
- Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander TG, el Hassan AM. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol*. 1999; 91: 314-320.
- Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo J, Bañuls AL, De Doncker S, Le Ray D, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect Genet Evol*. 2005; 5: 109-116.
- Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Wilber Quispe Tintaya K, Dujardin JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 2294-2297.
- Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimarães LH, Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol*. 2006; 63: 70-78.
- Gerber JS, Mosser DM. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol*. 2001; 166: 6861-6868.
- Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, de Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis*. 2007; 7: 7.



- Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. BMC Infect Dis. 2012; 12:75.
- Gomes LI, Gonzaga FM, de Moraes-Teixeira E, de Souza-Lima BS, Freire VV, Rabello A. Validation of quantitative real-time PCR for the in vitro assessment of antileishmanial drug activity. Exp Parasitol. 2012; 131: 175-179.
- Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? Clin Exp Immunol. 2007; 149: 440-444.
- Gontijo B, de Carvalho ML. [American cutaneous leishmaniasis]. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36: 71-80.
- Gontijo CMF, Da Silva ES, De Fuccio MB, De Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Acta Trop. 2002; 81: 143-150.
- Gontijo CMF, Pratlong F, Passos VMA, Falcão AL, Dedet JP. Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from Minas Gerais State, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1995; 90 (supl. I): 143.
- Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, Carvalho LP, Goldschmidt M, Carvalho EM, Scott P. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. PLoS Pathog. 2013; 9: e1003243.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol. 2003; 3: 23-35. Review.
- Goto H & Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010; 8: 419-433.
- Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. J Immunol. 1990; 145: 4290-4297.
- Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol. 1996; 34: 257-272. Review.
- Guerra CS, Silva RM, Carvalho LO, Calabrese KS, Bozza PT, Côrte-Real S. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. Int J Exp Pathol. 2010; 91: 451-459.
- Guimarães LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho EM. 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.
- Guy RA, Belosevic M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. Infect Immun. 1993; 61: 1553-1558.
- Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. J Physiol Pharmacol. 2003; 54: 469-487. Review.

- Hartley MA, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 2: 99. Review.
- Havenga MJ, van Dam B, Groot BS, Grimbergen JM, Valerio D, Bout A, Quax PH. Simultaneous detection of NOS-3 protein expression and nitric oxide production using a flow cytometer. *Anal Biochem*. 2001; 290: 283-291.
- Hejazi Sh, Hoseini S, Javanmard Sh, Zarkesh Sh, Khamesipour A. Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- $\beta$  in early and late lesions of patients with *Leishmania major* induced cutaneous leishmaniasis. *Iran J Parasitol*. 2012; 7: 16-23.
- Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am J Trop Med Hyg*. 1992; 46: 296-306. Review.
- Horta MF, Mendes BP, Roma EH, Noronha FS, Macêdo JP, Oliveira LS, Duarte MM, Vieira LQ. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol Res*. 2012; 2012: 203818.
- Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MN, Turco SJ, Soares RP. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasit Vectors*. 2013 Mar 7;6:54.
- Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, Alonso C, Corraliza I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol*. 2002; 24: 113-118.
- Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, Zangger H, Revaz-Breton M, Lye LF, Hickerson SM, Beverley SM, Acha-Orbea H, Launois P, Fasel N, Masina S. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*. 2011; 331: 775-778.
- Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev*. 2003a; 16: 637-646. Review.
- Jara M, Adai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, Cruz M, Cruz I, Van der Auwera G, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC, Arevalo J. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 1826-1833.
- Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol*. 2005; 174: 7147-7153.
- John B, Hunter CA. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? *Science*. 2008; 321: 917-918.
- Johnson E, Hetland G. A sensitive method to detect synthesis of the functional classical, alternative and terminal pathway of complement by cells cultured in vitro. *Scand J Clin Lab Invest*. 1988; 48: 223-231.

- Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*. 2001; 166: 1141-1147.
- Kavoosi G, Ardestani SK, Kariminia A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology*. 2009; 136: 1193-1199.
- Kawa H, Sabroza PC, Oliveira, RM, Barcellos C. Production of transmission foci for cutaneous leishmaniasis: the case of Pau da Fome, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Publica* 2010; 26: 1495-1507.
- Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9: 604-615. Review.
- Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ, McMahon-Pratt D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 2000; 191: 1063-1068.
- Kima PE, Soong L. Interferon gamma in leishmaniasis. *Front Immunol*. 2013; 4: 156.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27: 485-517. Review.
- Körner H, McMorran B, Schlüter D, Fromm P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. *Int J Parasitol*. 2010; 40: 879-888. Review.
- Körner H, Sedgwick JD. Tumour necrosis factor and lymphotoxin: molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity. *Immunol Cell Biol*. 1996; 74: 465-472. Review.
- Kostka LS, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol*. 2009; 182: 3039-3046.
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun*. 2004; 72: 1920-1928.
- Kumar R, Bumb RA, Salotra P. Correlation of parasitic load with interleukin-4 response in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009; 57: 239-246.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters Killick-Dendrick. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, London, Academic Press. 1987; 1: 1-20.
- Lainson R. The American Leishmaniasis: some observation on their ecology and epidemiology. *Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1983; 77: 569-596.
- Langfelder P, Horvath S. Fast R Functions for Robust Correlations and Hierarchical Clustering. *J Stat Softw*. 2012; 46(11), i11.

- Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*. 2008; 213: 183-191.
- Launois P, Ohteki T, Swihart K, MacDonald HR, Louis JA. In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4<sup>+</sup> T cells which are NK1.1<sup>-</sup>. *Eur J Immunol*. 1995; 25: 3298-3307.
- Lee HH, Molla MN, Cantor CR, Collins JJ. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*. 2010; 467: 82-85.
- Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 65: 87-89.
- Liew FY, Li Y, Moss D, Parkinson C, Rogers MV, Moncada S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur J Immunol*. 1991; 21: 3009-3014.
- Lima HC, Vasconcelos AW, David JR et al. American cutaneous leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 50: 743- 747.
- Lin ZY, Chuang WL. Pharmacologic concentrations of ascorbic acid cause diverse influence on differential expressions of angiogenic chemokine genes in different hepatocellular carcinoma cell lines. *Biomed Pharmacother*. 2010; 64: 348-51.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C(T)$ ) Method. *Methods*. 2001; 25: 402-408.
- Locksley RM, Heinzl FP, Sadick MD, Holaday BJ, Gardner KD Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol*. 1987; 138: 744-749.
- Locksley RM, Scott P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunol Today*. 1991; 12: 58-61.
- Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*. 2002; 162: 1028-1032.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
- Luiza-Silva M, Martins MA, Espírito-Santo LR, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JG, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine*. 2011; 29: 583-592.
- Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14: 129-135. Review.
- Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2001; 2: 102-107. Review.

- Lykens JE, Terrell CE, Zoller EE, Divanovic S, Trompette A, Karp CL, Aliberti J, Flick MJ, Jordan MB. Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. *J Immunol.* 2010; 184: 877-885.
- Marques MJ, Volpini AC, Machado-Coelho GL, Machado-Pinto J, da Costa CA, Mayrink W, Genaro O, Romanha AJ. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 54: 37-43.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80: 859-876. Review.
- Martínez-Arends A, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Mosca W, Valecillos L, Convit J. Immunocytochemical characterization of immune cells in lesions of American cutaneous leishmaniasis using novel T cell markers. *Acta Trop.* 1991; 49: 271-280.
- Martins AV, Barretto MP, Brener Z, Pellegrino J. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 1956; 8: 577-581.
- Martins WK. A useful procedure to isolate simultaneously DNA and RNA from a single tumor sample. *Protocol Exchange* 2009. Disponível em: <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/602>.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza WJS. Reação de imunofluorescência indireta e intradermorreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro): estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1980; 22: 149-155.
- McDowell MA, Sacks DL. Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. *Curr Opin Microbiol.* 1999; 2: 438-443. Review.
- Melby PC, Andrade-Narvaez FJ, Darnell BJ, Valencia-Pacheco G, Tryon VV, Palomo-Cetina A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994; 62: 837-842.
- Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schröder NW, Bienzle U, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 177-182.
- Monteforte GM, Takeda K, Rodriguez-Sosa M, Akira S, David JR, Satoskar AR. Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop Th1 response and control cutaneous *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 2000; 164: 5890-5893.
- Montenegro J. Anatomopatologia da leishmaniose cutânea [in Portuguese]. *An Paul Med Cir.* 1924; 15: 5-11.
- Morehead J, Coppens I, Andrews NW. Opsonization modulates Rac-1 activation during cell entry by *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* 2002; 70: 4571-4580.

- Morris SM Jr. Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr.* 2004; 134: 2743S-2747S; discussion 2765S-2767S. Review.
- Mossalayi MD, Arock M, Debré P. CD23/Fc epsilon RII: signaling and clinical implication. *Int Rev Immunol.* 1997; 16: 129-146. Review.
- Mosser DM, Brittingham A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology.* 1997; 115 Suppl: S9-23. Review.
- Mosser DM, Edelson PJ. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J Immunol.* 1984; 132: 1501-1505.
- Mosser DM, Edelson PJ. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol.* 1985; 135: 2785-2789.
- Mosser DM, Edelson PJ. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature* 1987; 327: 329-331.
- Mosser DM, Handman E. Treatment of murine macrophages with interferon-g inhibits their ability to bind *Leishmania* promastigotes. *J. Leukocyte Biol.* 1992; 52: 369-376.
- Mosser DM, Rosenthal LA. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol.* 1993; 4: 315-322.
- Mosser DM, Springer TA, Diamond MS. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.* 1992; 116: 511-520.
- Mosser DM, Zhang X. Activation of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008; Chapter 14: Unit 14.2.
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003; 73: 209-212. Review.
- Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev.* 2011; 240: 286-296. Review.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005; 366: 1561-1577. Review.
- Musso O, Sommer P, Drouet E, Cotte L, Neyra M, Grimaud JA, Chevallier M. In situ detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. *J Virol Methods.* 1996; 56: 125-137.
- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994; 78: 915-918. Review.
- Nathan C. Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring Inst Mitt.* 1991; 88: 200-207. Review.

- Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, Cardoso TM, Ramasawmy R, Oliveira WN, Schriefer A, Carvalho EM. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. *Parasite Immunol.* 2011; 33: 132-136.
- Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2012; 34: 551-561. Review.
- Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 2007; 28: 378-384. Review.
- Oliveira F, Bafica A, Rosato AB, Favali CB, Costa JM, Cafe V, Barral-Netto M, Barral A. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 85: 70-73.
- Oliveira MC, Amorim RF, Freitas Rde A, Costa Ade L. [A fatal case of mucocutaneous leishmaniasis after pentavalent antimonial use]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38: 258-260. Portuguese.
- Oliveira-Neto MP, Mattos M, Pirmez C, Fernandes O, Gonçalves-Costa SC, Souza CF, Grimaldi G Jr. Mucosal leishmaniasis ("espundia") responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000; 42: 321-325.
- Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, Gonçalves-Costa SC, Brahni LR, Menezes CR, Pirmez C. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol.* 2000; 39: 506-514.
- O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 353-364. Review.
- Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008; 28: 454-467. Review.
- Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech.* 2003; 14: 33-43.
- Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine.* 1999; 11: 305-312.
- Ozbilge H, Aksoy N, Gurel MS, Yazar S. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. *J Med Microbiol.* 2006; 55: 1329-1331.
- Passos VM, Falcão AL, Marzochi MC, Gontijo CM, Dias ES, Barbosa-Santos EG, Guerra HL, Katz N. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993; 88: 103-110.
- Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1996; 22: 1-13. Review.

- Pena JL & Heller L. Environmental sanitation and indian health: an assessment on the Xakriabá population, Minas Gerais. *Eng Sanit Ambient.* 2008; 13: 63-72.
- Pena JL. Perfil sanitário, indicadores demográficos e saúde ambiental após a implantação do distrito sanitário especial indígena: o caso dos Xacriabá em Minas Gerais. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da UFMG - Belo Horizonte, 2004.
- Pessoa SB, Barreto MP. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. Imprensa Nacional do Ministério da Educação e Saúde. 1984; 1-527.
- Peters C, Aebischer T, Stierhof YD, Fuchs M, Overath P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci.* 1995; 108: 3715-3724.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 2008; 321: 970-974. Erratum in: *Science.* 2008; 322: 1634.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 2008; 321: 970-974. Erratum in: *Science.* 2008; 322: 1634.
- Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M et al. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol.* 1990; 145: 3100-4.
- Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degrave W, Fernandes O. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1819-1823.
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1993; 91: 1390-1395.
- Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, Brazil RP, Britto C. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2012; 5: 15.
- Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, Argiro L, el Kheir M, Bucheton B, Mary C, El-Safi SH, Dessein A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest.* 2009; 119: 2379-2387.
- Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 2002; 70: 4638-4642.



- Quaresma PF. Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde na área de Concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Ministério da Saude. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou - Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/5505>. Acessado em 20 de Julho 2013.
- R Development Core Team, 2011. R: A language and environment for statistical computing, reference index version 2.13.0. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Racoosin EL, Beverley SM. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp Parasitol*. 1997; 85: 283-295.
- Ramasawmy R, Menezes E, Magalhães A, Oliveira J, Castellucci L, Almeida R, Rosa ME, Guimarães LH, Lessa M, Noronha E, Wilson ME, Jamieson SE, Kalil J, Blackwell JM, Carvalho EM, de Jesus AR. The -2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol*. 2010; 10: 607-613.
- Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13: 151-177. Review.
- Reiner SL, Zheng S, Wang ZE, Stowring L, Locksley RM. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J Exp Med*. 1994; 179: 447-456.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7: 581-596. Review.
- Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 21-25.
- Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31: 143-148.
- Ritter U, Körner H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2002; 24: 295-301.
- Ritter U, Moll H, Laskay T, Bröcker E, Velazco O, Becker I, Gillitzer R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1996; 173: 699-709.
- Ritter U, Moll H. Monocyte chemoattractant protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *Eur J Immunol*. 2000; 30: 3111-3120.
- Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC, Barral A, Coffman RL, Carvalho EM. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1999; 180: 1731-1734.
- Rocha RA, Sampaio RN, Guerra M, Magalhães A, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD. Apparent Glucantime failure in five patients with mucocutaneous leishmaniasis. *J Trop Med Hyg*. 1980; 83: 131-139.

- Romero GA, Sampaio RN, Macedo Vde O, Marsden PD. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94: 505-508.
- Rosas LE, Keiser T, Barbi J, Satoskar AA, Septer A, Kaczmarek J, Lezama-Davila CM, Satoskar AR. Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. Int Immunol. 2005; 17: 1347-1357.
- Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrli ME, Mosser DM. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. Infect Immun. 1996; 64: 2206-2215.
- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat Rev Immunol. 2002; 2: 845-858.
- Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immunol. 2002; 3: 1041-1047. Review.
- Sadick MD, Heinzl FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Locksley RM. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. J Exp Med. 1990; 171: 115-127.
- Sadigursky M, Brodskyn CI. A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. Am J Trop Med Hyg. 1986; 35: 942-944.
- Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcaïs A, Argiro L, Dessein A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. J Immunol. 2008; 180: 6139-6148.
- Sampaio RN, de Paula CD, Sampaio JH, Furtado Rde S, Leal PP, Rosa TT, Rodrigues ME, Veiga JP. [The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of pentavalent antimony administered in a dose of 40 mg Sb V/kg/day, 12/12 hr, for 30 days in the mucocutaneous form of leishmaniasis]. Rev Soc Bras Med Trop. 1997; 30: 457-463. Portuguese.
- Santiago HC, Oliveira CF, Santiago L, Ferraz FO, de Souza D G, de-Freitas LA, Afonso LC, Teixeira MM, Gazzinelli RT, Vieira LQ. Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. Infect Immun. 2004; 72: 4918-4923.
- Santos CS, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, Costa J, Borges VM, de Oliveira CI, Van Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. CD8+ granzyme B+-mediated tissue injury vs. CD4+IFN $\gamma$ + mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. J Invest Dermatol. 2013; 133: 1533-1540.
- Saraiva EM, Vannier-Santos MA, Silva-Filho FC, de Souza W. Anionic site behavior in *Leishmania* and its role in the parasite-macrophage interaction. J Cell Sci. 1989; 93: 481-489.
- Schachnik NC, Peruhype-Magalhães V, Paula GM, Lucas F Jr, Freitas VM, Martins-Filho OA, Dusse LM. Intracellular nitric oxide assessment in whole blood leukocytes by flow cytometry: optimization and applicability to monitor patients with chronic graft nephropathy. J Immunol Methods. 2009; 343: 103-111.

- Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 374-389. Review.
- Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.* 1988; 168: 1675-1684.
- Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev.* 1989; 112: 161-182. Review.
- Scott P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 1989; 68: 369-372.
- Shimabukuro PHF, Silva TRR, Ribeiro FOF, Baton LA, Galati EAB. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors* 2010; 3: 121.
- Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009; 31: 423-431. Review.
- Singh RK, Srivastava A, Singh N. Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiol Res.* 2012; 167: 445-451. Review.
- Skinner HA, Holt S, Schuller R, Roy J, Israel Y. Identification of alcohol abuse using laboratory tests and a history of trauma. *Ann Intern Med.* 1984; 101: 847-851.
- 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.
- Souza MA, Castro MC, Oliveira AP, Almeida AF, Reis LC, Silva CJ, Brito ME, Pereira VR. American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. *Scand J Immunol.* 2012; 76: 175-180.
- Souza WJS, Sabroza PC, Santos CS, Souza E, Henrique MF, Coutinho SG. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop.* 1992; 52: 111-119.
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992; 176: 287-292.
- Stenger S, Thüning H, Röllinghoff M, Bogdan C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med.* 1994; 180: 783-793.
- Stoltzfus RJ & Dreyfuss ML. Guidelines for the Use of Iron Supplements to Prevent and Treat Iron Deficiency Anemia. International Nutritional Anemia Consultative Group, Washington. 1998; 46p.

- Strijdom H, Muller C, Lochner A. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 37: 897-902.
- Sutterwala FS, Noel GJ, Clynes R, Mosser DM. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med.* 1997; 185: 1977-1985.
- Teixeira MJ, Fernandes JD, Teixeira CR, Andrade BB, Pompeu ML, Santana da Silva J, Brodskyn CI, Barral-Netto M, Barral A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun.* 2005; 73: 1191-1195.
- Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2006; 22: 32-40. Review.
- Thomas BN, Buxbaum LU. FcγRIII mediates immunoglobulin G-induced interleukin-10 and is required for chronic *Leishmania mexicana* lesions. *Infect Immun.* 2008; 76: 623-631.
- Toki S, Kagaya S, Shinohara M, Wakiguchi H, Matsumoto T, Takahata Y, Morimatsu F, Saito H, Matsumoto K. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus casei* suppress *Escherichia coli*-induced chemokine expression in intestinal epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009; 148: 45-58.
- Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, Almusawi T, Duarte MI, Amato Neto V. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun.* 2008; 76: 866-872. Review.
- Tuon FF, Fernandes ER, Duarte MI, Amato VS. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2012; 54: 159-163.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1829-1834.
- van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 51: 133-142.
- van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 2004; 173: 6521-6525.
- Vargas-Inchaustegui DA, Xin L, Soong L. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. *J Immunol.* 2008; 180: 7537-7545.
- Vasquez RE, Soong L. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Infect Immun.* 2006; 74: 6769-6777.
- Vester B, Müller K, Solbach W, Laskay T. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun.* 1999; 67: 3155-3159.

- Vieira MG, Oliveira F, Arruda S et al. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97: 979-983.
- von Stebut E. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp Dermatol*. 2007;16: 340-346. Review.
- Vouldoukis I, Issaly F, Fourcade C, Paul-Eugène N, Arock M, Kolb JP, da Silva OA, Monjour L, Poinot H, Tselentis Y, et al. CD23 and IgE expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis: possible role in monocyte activation. *Res Immunol*. 1994; 145: 17-27.
- Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Bécherel P, Debré P, Moncada S, Mossalayi MD. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 7804-7808.
- Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res*. 2008; 41: 15-25. Review.
- Ward SG, Bacon K, Westwick J. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity*. 1998; 9: 1-11. Review.
- Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia NG. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 44: 260-271.
- Wetzel DM, McMahon-Pratt D, Koleske AJ. The Abl and Arg kinases mediate distinct modes of phagocytosis and are required for maximal *Leishmania* infection. *Mol Cell Biol*. 2012; 32: 3176-3186.
- WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html) Acessado em 20 de Julho 2013.
- Wilson ME, Pearson RD. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J Immunol*. 1986; 136: 4681-4688.
- Wilson ME, Pearson RD. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun*. 1988; 56: 363-369.
- Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, Waisman A, Nigg AP, Knop J, Udey MC, von Stebut E. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc gamma receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med*. 2006; 203: 177-188.
- Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, Weina P, Ockenhouse CF. Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 73: 999-1004.

---

Wortmann G, Sweeney C, Houg HS, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, Ockenhouse C. Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65: 583-587.

Zangger H, Ronet C, Desponds C, Kuhlmann FM, Robinson J, Hartley MA, Prevel F, Castiglioni P, Pratlong F, Bastien P, Müller N, Parmentier L, Saravia NG, Beverley SM, Fasel N. Detection of Leishmania RNA virus in Leishmania parasites. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7: e2006.

Zaph C, Scott P. Interleukin-12 regulates chemokine gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. *Infect Immun.* 2003; 71: 1587-1589.

Zhang Q, Lambert G, Liao D, Kim H, Robin K, Tung CK, Pourmand N, Austin RH. Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments. *Science.* 2011; 333:1764-1767.

Zhang Z, Bryan JL, DeLassus E, Chang LW, Liao W, Sandell LJ. CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  and NF- $\kappa$ B mediate high level expression of chemokine genes CCL3 and CCL4 by human chondrocytes in response to IL-1 $\beta$ . *J Biol Chem.* 2010; 285: 33092-33103.