

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO
PARASITO-HOSPEDEIRO**

Ana Carolina Vieira da Costa

Avaliação da produção de interleucina 6, fator de necrose tumoral e interleucina 10 em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada

**Goiânia
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ [X] Dissertação ☐ [] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Ana Carolina Vieira da Costa

Título do trabalho: Avaliação da produção de interleucina 6, fator de necrose tumoral e interleucina 10 em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ [X] SIM ☐ [] NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Ana Carolina Vieira da Costa
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 02 / 05 / 17

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de

Ana Carolina Vieira da Costa

Avaliação da produção de interleucina 6, fator de necrose tumoral e interleucina 10 em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Fátima Ribeiro Dias

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Costa, Ana Carolina Vieira da
Avaliação da produção de interleucina 6, fator de necrose tumoral e
interleucina 10 em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose
Cutânea Localizada [manuscrito] / Ana Carolina Vieira da Costa. -
2017.
xvi, 101 f.: il.

Orientador: Profa. Fátima Ribeiro Dias.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2017.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Leishmaniose. 2. Citocinas. 3. Hemocultura. I. Dias, Fátima
Ribeiro, orient. II. Título.

CDU 612.017



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ANA CAROLINA VIEIRA DA COSTA - Aos dez dias do mês de março do ano de 2017 (10/03/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profas. Dras. FÁTIMA RIBEIRO DIAS, LEDICE INACIA DE ARAUJO PEREIRA e LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA 6, FATOR DE NECROSE TUMORAL E INTERLEUCINA 10 EM HEMOCULTURAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA”**, em nível de **MESTRADO**, de autoria de **ANA CAROLINA VIEIRA DA COSTA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. FÁTIMA RIBEIRO DIAS, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1406/2016 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias
Profa. Dra. Ledice Inácia de Araujo Pereira
Profa. Dra. Ludimila Paula Vaz Cardoso

Aprovada / Reprovada

APROVADA
APROVADA
APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 15 h 30 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias (IPTSP/UFG)
Profa. Dra. Ledice Inácia de Araujo Pereira (IPTSP/UFG)
Profa. Dra. Ludimila Paula Vaz Cardoso (CAJ/UFG)
Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

Fátima Ribeiro Dias
Ledice Inácia de Araujo Pereira
Ludimila Paula Vaz Cardoso
Kariny Soares e Silva

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Ana Carolina Vieira da Costa

Orientador (a): Fátima Ribeiro Dias

Membros:

- 1. Fátima Ribeiro Dias**
- 2. Ludimila Paula Vaz Cardoso**
- 3. Ledice Inacia de Araujo Pereira**

Data: 10/03/2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente à Deus por ter ouvido minhas orações e encaminhado tudo para que esse sonho pudesse ser realizado.

À minha família, especialmente, minha mãe, uma mulher batalhadora que sempre me ajudou e apoiou e minha avó paterna que me ajudou muito no caminho trilhado antes de chegar aqui.

Aos meus professores da graduação por me inspirar.

À minha orientadora, pela confiança, dedicação, ensinamentos e parceria. Ao colega professor Rodrigo, à professora Ludimila e à Dra. Ledice pela atenção e prontidão.

À todos meus colegas de laboratório, principalmente a Valéria e a Larissa, integrantes da minha equipe.

Aos portadores de leishmaniose tegumentar americana e doadores sadios que participaram e contribuíram para este estudo.

Aos funcionários do Banco de Sangue do INGOH, pelo auxílio com as doações de sangue.

Às agências de fomento FAPEG e CNPq pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

TABELAS E FIGURAS.....	ix
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana: aspectos gerais.....	1
1.2 As formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	3
1.3 Imunologia da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	4
1.4 Os monócitos na leishmaniose.....	9
1.5 Diagnóstico e Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4 METODOLOGIA	17
4.1 Aspectos éticos, critérios de inclusão e diagnóstico de LTA.....	17
4.2 Colheita de dados clínicos e laboratoriais.....	17
4.3 Tratamento e acompanhamento dos pacientes, critérios de cura e gravidade...17	
4.4 Obtenção dos antígenos de <i>L. (V.) braziliensis</i>	18
4.5 Colheita de sangue e hemoculturas.....	18
4.6 Avaliação das citocinas.....	19
4.7 Análises estatísticas.....	19
5 RESULTADOS.....	21
5.1 Características dos pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	21
5.2 Avaliação da produção de citocinas pró- e anti-inflamatória em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	22
5.3 Avaliação da interação entre os agonistas de TLR2 e de NOD2 para a indução de citocinas em hemoculturas de pacientes com leishmaniose cutânea localizada.....	25
5.4 Avaliação da associação entre os dados clínicos e a produção de citocinas em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	32

5.5 Avaliação da associação da produção de citocinas em hemoculturas de pacientes com o desfecho clínico após terapia.....	45
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO 1	75
ANEXO 2	93

TABELAS E FIGURAS

TABELAS

Tabela 1 Características de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada e de controles.....	22
--	----

FIGURAS

Figura 1 Esquema do ciclo de transmissão de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	2
Figura 2 Avaliação da produção de interleucina 6 (IL-6) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada.....	23
Figura 3 Avaliação da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada.....	24
Figura 4 Avaliação da produção de interleucina 10 (IL-10) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada.....	25
Figura 5 Avaliação da produção de interleucina 6 (IL-6) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada, após estímulos com agonistas de TLR2, NOD2 e antígeno de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	26
Figura 6 Efeito aditivo entre agonistas de TLR2/NOD2 e de antígeno de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> /agonista NOD2 na produção de interleucina 6 (IL-6) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada.....	27
Figura 7 Avaliação da produção de TNF α em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada, após estímulos com agonistas de TLR2, NOD2 e antígeno de <i>Leishmania V. braziliensis</i>	28
Figura 8 Efeitos aditivos entre agonistas de TLR2, NOD2 e antígeno de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> na produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada.....	29
Figura 9 Avaliação da produção de interleucina 10 (IL-10) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada, após estímulos com agonistas de TLR2, NOD2 e antígeno de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	30

Figura 10 Avaliação dos efeitos aditivos entre agonistas de TLR2, NOD2 e antígeno de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> na produção de interleucina 10 (IL-10) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada.....	31
Figura 11 Avaliação da correlação entre o número de lesões e as concentrações de IL-6 nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	33
Figura 12 Avaliação da correlação entre o número de lesões e as concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	34
Figura 13 Avaliação da correlação entre o número de lesões e as concentrações de interleucina 10 (IL-10) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	35
Figura 14 Avaliação da produção de interleucina 6 (IL-6) em pacientes com uma lesão e pacientes com mais de uma lesão.....	36
Figura 15 Avaliação da produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em pacientes com uma lesão e pacientes com mais de uma lesão.....	37
Figura 16 Avaliação da produção de interleucina 10 (IL-10) em pacientes com uma lesão e pacientes com mais de uma lesão.....	38
Figura 17 Avaliação da correlação entre o tamanho das lesões e as concentrações de interleucina 6 (IL-6) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	39
Figura 18 Avaliação da correlação entre o tamanho das lesões e as concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	40
Figura 19 Avaliação da correlação entre o tamanho das lesões e as concentrações de interleucina 10 (IL-10) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	41
Figura 20 Avaliação da correlação entre o tempo de lesão e as concentrações de interleucina 6 (IL-6) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	42
Figura 21 Avaliação da correlação entre o tempo de lesão e as concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	43

Figura 22 Avaliação da correlação entre o tempo de lesão e as concentrações de interleucina 10 (IL-10) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada.....	44
Figura 23 Avaliação da produção de interleucina 6 (IL-6) em pacientes clinicamente curados com um ciclo de tratamento e pacientes curados com mais de um ciclo de tratamento.....	46
Figura 24 Avaliação da produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em pacientes clinicamente curados com um ciclo de tratamento e pacientes curados com mais de um ciclo de tratamento.....	47
Figura 25 Avaliação da produção de interleucina 10 (IL-10) em pacientes clinicamente curados com um ciclo de tratamento e pacientes curados com mais de um ciclo de tratamento.....	48

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ELISA – Ensaio imunoenzimático
Gp63 – Glicoproteína de 63 KDa
HDT/GO – Hospital de Doenças Tropicais (Anuar Auad) do estado de Goiás
IFN γ – Interferon gama
IL – Interleucina
INGOH – Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia
IDRM – Intradermorreação de Montenegro
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
LCD – Leishmaniose cutânea difusa
LD – Leishmaniose disseminada
LCM – Leishmaniose cutâneo-mucosa
LM – Leishmaniose mucosa
LPG – Lipofosfoglicano
LPS – Lipopolissacarídeo
LV – Leishmaniose visceral
NF- κ B – Fator nuclear *kappa B*
NK – Célula *Natural Killer*
NLR – Receptores semelhantes a *NOD*
NLRP3 – Proteínas que contém o domínio NHCHT-LRR e pirina 3
NO – Óxido nítrico
NOD – Domínio de oligomerização de nucleotídeo
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
PBS – Solução salina tamponada com fosfatos
PCR – Reação da polimerase em cadeia
PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões
RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SLA – Antígeno solúvel de leishmânia

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β – Fator transformador de crescimento β

Th1 – Linfócito T auxiliar do tipo 1

Th17 – Linfócito T auxiliar do tipo 17

Th2 – Linfócito T auxiliar do tipo 2

TLR – Receptores semelhantes a *Toll*

TNF – Fator de necrose tumoral

Tregs – Linfócitos T reguladores

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete a pele e/ou mucosas. Os monócitos são precursores de macrófagos, células hospedeiras do parasito, e pouco se sabe sobre seu nível de ativação durante a LTA. O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de resposta de citocinas produzidas por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL) em hemoculturas, após ativação com agonistas de receptores similares a *toll* (TLRs) e de receptor NOD2. O sangue periférico de pacientes com LCL, com lesões ativas e sem tratamento, e de indivíduos controles, pareados por sexo e idade, foi diluído em meio de cultura e incubado com lipopolissacarídeo (LPS), agonista de TLR4; lipopeptídeo Pam₃Cys (Pam), agonista de TLR2; muramildipeptídeo (MDP), agonista de NOD2 ou antígenos de *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag). Após incubação, os sobrenadantes foram colhidos para dosagem de IL6 e TNF α (6 h) e IL-10 (24 h), por ELISA. Nas hemoculturas dos pacientes e dos controles, houve produção de IL-6, TNF α e IL-10, após incubação com todos os estímulos ($p < 0,05$, Meio vs estímulos, $n = 29$). Ao comparar pacientes e controles, não houve diferença quanto à produção de TNF α e IL-10, mas a produção de IL-6 foi maior nas hemoculturas não estimuladas dos pacientes ($p < 0,05$, $n = 29$) e na presença do MDP ($p < 0,05$, $n = 19$). A combinação Pam/MDP aumentou a produção de IL-6, TNF α e IL-10 nas hemoculturas dos pacientes e controles, em relação a cada estímulo sozinho ($p < 0,05$, $n = 13 - 14$); de maneira similar, Ag e MDP juntos aumentaram a concentração de IL-6, TNF α e IL-10 (IL-6 e IL-10, especialmente nas hemoculturas dos pacientes) ($p < 0,05$, $n = 11 - 14$). Não houve correlação significativa entre o número, o tamanho e o tempo das lesões dos pacientes com LCL e as concentrações de IL-6, TNF α e IL-10 nas hemoculturas dos mesmos. Quando comparados os pacientes clinicamente curados após um ciclo de medicamento e aqueles clinicamente curados após mais de um ciclo de medicamento em relação às concentrações de TNF α e IL-10 não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos, porém, em relação à produção de IL-6, foi observado que esta foi mais elevada nos pacientes curados com mais de um ciclo de medicamento, após o estímulo MDP ($p < 0,05$, $n = 17$ curados com 1 ciclo vs 8

curados com mais de 1 ciclo). Os dados sugerem que os monócitos de pacientes com LCL podem ser ativados via TLR2, TLR4 e NOD2, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, $\text{TNF}\alpha$) e anti-inflamatória (IL-10) e a IL-6 pode estar associada ao dano tecidual e a demora na cura dos pacientes, possuindo um papel imunopatogênico na LCL humana.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The parasite is hosted by macrophages in cutaneous or mucosal lesions. Monocytes are precursors of macrophages, but there is little information about monocyte activation during ATL. The present study aimed to evaluate cytokine profile of monocytes from patients with localized cutaneous leishmaniasis (LCL) in whole blood cultures stimulated with *toll*-like receptor (TLRs) and NOD2 receptor agonists. Peripheral blood from patients with active lesions and no treatment, and from healthy blood donors paired by sex and age, was diluted into culture medium and incubated with lipopolysaccharide (LPS), TLR4 agonist; lipopeptide Pam₃Cys (Pam), TLR2 agonist; muramyl dipeptide (MDP), NOD2 agonist or *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* antigen (Ag). After incubation, supernatants were collected to measure IL-6 and TNF α (6 h) and IL-10 (24 h) by ELISA. There was production of IL-6, TNF α and IL-10 in cultures from patients and controls after stimulation with all agonists and Ag ($p < 0.05$, medium vs stimulus, $n = 29$). No differences were detected between concentrations of TNF α and IL-10, but IL-6 was higher produced in non-stimulated cultures from patients than controls ($p < 0.05$, $n = 29$) or when the stimulus was MDP ($p < 0.05$, $n = 19$). The combination Pam/MDP increased the production of IL-6, TNF α and IL-10 in cultures from patients and controls when compared with each stimulus isolated ($p < 0.05$, $n = 13 - 14$); similarly, Ag and MDP together induced higher concentrations of IL-6, TNF α and IL-10 (IL-6 and IL-10, especially in cultures from patients) in comparison with each stimulus ($p < 0.05$, $n = 11 - 14$). There was no correlation between the number, size or time of lesions and levels of IL-6, TNF α or IL-10. Patients with more than one cycle of treatment to obtain clinical cure showed higher levels of MDP-induced IL-6 than those cured with one cycle of treatment ($p < 0.05$, $n = 17$ cured with one cycle vs 8 cured with more than one cycle). Data suggest that LCL patient monocytes can be activated via TLR2, TLR4 or NOD2 to produce pro-inflammatory (IL-6, TNF α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines and IL-6 can be associated with tissue lesion and delay of lesion healing indicating an immunopathogenic role in LCL.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana: aspectos gerais.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma infecção crônica, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A maioria das infecções ocorre como zoonoses entre animais silvestres, sendo o homem um hospedeiro acidental no ciclo de transmissão. O parasito é transmitido pela picada de um inseto vetor da sub-família *Phlebotominae*, do gênero *Lutzomyia* (Gontijo & Carvalho 2003; Almeida & Santos 2011). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo infectada, introduz a forma do parasito, denominada promastigota metacíclica, no hospedeiro vertebrado (animais silvestres ou o ser humano), a qual é fagocitada por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, diferenciando-se nestes em formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Posteriormente, se um flebotomíneo não infectado alimentar-se do sangue ou linfa intersticial de um hospedeiro infectado (animais silvestres, como marsupiais e roedores), ele ingere formas amastigotas que irão se diferenciar em formas promastigotas procíclicas no intestino do inseto. As formas metacíclicas, posteriormente, alcançam a probóscide, podendo ser inoculadas em um hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo, completando o ciclo heteroxênico (Rey 2001; Neves 2011). A Figura 1 apresenta o ciclo de transmissão da LTA.

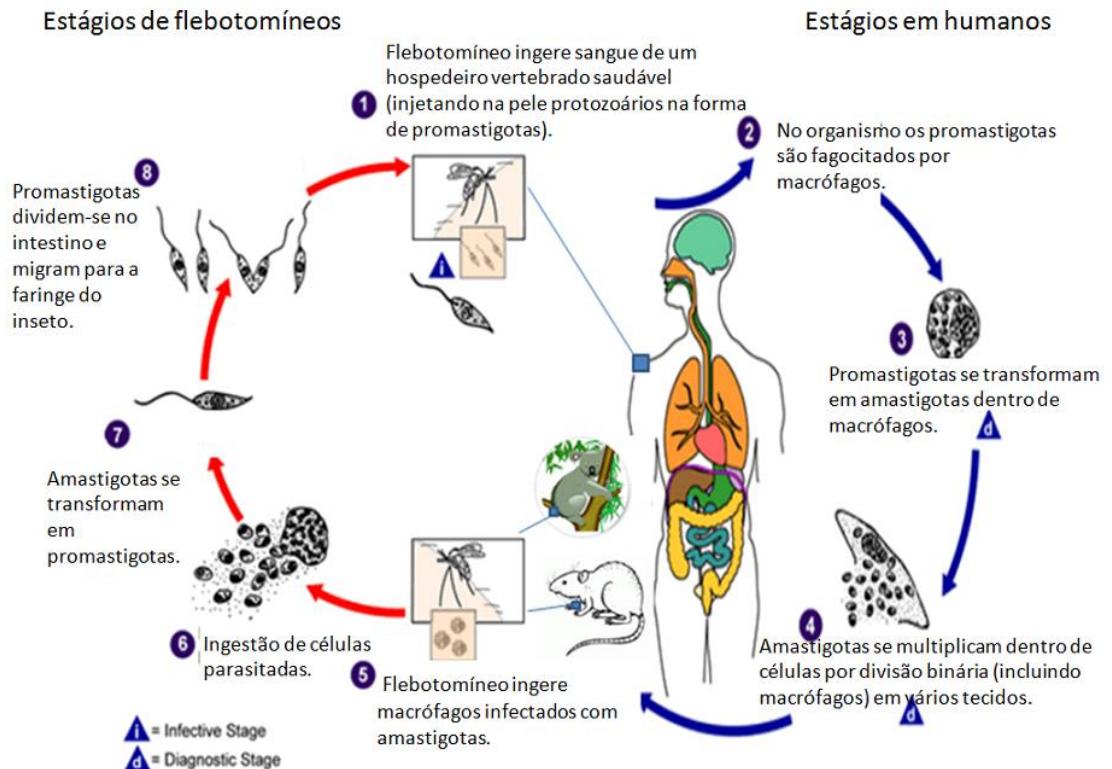


Figura 1. Esquema do ciclo de transmissão de parasitos do gênero *Leishmania*. Adaptado de Centers For Disease Control And Prevention, EUA. (<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>)

No Brasil, as principais espécies de *Leishmania* causadoras de LTA são: *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (Viannia) guyanensis*, associadas com lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou mucosas (oral, nasal e faringiana), e *L. (Leishmania) amazonensis*, relacionada com o desenvolvimento de lesões cutâneas localizadas ou disseminadas/difusas da LTA. Dentre estas espécies, *L. (V.) braziliensis* é a mais prevalente e cerca de 1 a 10% dos pacientes infectados por esta espécie apresentam a forma clínica mucosa ou mucocutânea (Ashford 2000; Gontijo & Carvalho 2003; Guerra et al. 2011).

Nos últimos 20 anos, tem-se observado um aumento do número de casos de todas as formas de Leishmaniose. Fatores como mudanças ambientais, migrações descontroladas, turismo ecológico, trabalho em áreas de risco, dificuldades de tratamento, hospedeiros imunocomprometidos, entre outros, propiciam contatos entre reservatório/homem e o vetor (Shaw 2007).

A leishmaniose tegumentar é amplamente distribuída no mundo, sendo estimado que ocorram, anualmente, cerca de 0,7 a 1,3 milhão de novos casos (WHO, 2013). O Brasil está entre os 10 países que respondem por cerca de 70 a

75% dos casos de leishmaniose cutânea no mundo, tendo uma média anual de 22.534 novos casos (Alvar et al. 2012; WHO 2013). Os maiores percentuais de casos no país ocorrem nas regiões Norte e Nordeste, seguidos das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (SINAN/SVS/MS 2014). No estado de Goiás, o número de casos de LTA confirmados/notificados em 2010 foram 553, em 2011, 314, em 2012, 310, em 2013, 355 e 2014, 535 (SINAN/SVS/MS 2014). Os municípios com maiores números de casos foram: Niquelândia, Minaçu, Goiânia, Mineiros, Baliza, Doverlândia, São Miguel do Araguaia, Rio Verde, São Domingos, Caiapônia, Uruaçu, Aparecida de Goiânia, Jataí e Porangatu. O sexo masculino responde por 70,9% dos casos de LTA no estado (SVS/MS/GO 2011).

1.2 As formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

O estabelecimento da infecção primária e o desenvolvimento da LTA, clinicamente, dependem de fatores do parasito (genótipo, determinantes de invasão ou evasão e patoantigenicidade); do hospedeiro (desnutrição, imunossupressão e genética) e do vetor (componentes da saliva). Além disto, a quantidade de parasitos inoculados e o estado de ativação dos macrófagos também influenciam no desfecho da infecção (Reithinger et al. 2007).

A leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada pela presença de lesões na pele, que se iniciam no local de inoculação das formas promastigotas infectantes. A lesão primária é geralmente única, embora várias picadas do flebotomíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões. A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais comum da doença com uma a vinte lesões. A LCL se manifesta, após um período de incubação (10 dias a três meses), como uma pápula eritematosa que progride para nódulo. São freqüentes as ulcerações com bordas elevadas, endurecidas e o fundo com tecido de granulação grosseira. O quadro predomina nas áreas corpóreas descobertas e se instala em pacientes de áreas endêmicas ou que lá estiveram recentemente (Marzochi 1992; Furtado 1994; Brasil 2007).

O acometimento das mucosas oral e nasal pode surgir com a lesão cutânea ainda em atividade (leishmaniose cutâneo-mucosa, LCM) ou anos após sua cicatrização. Cerca de 3 a 5% dos indivíduos portadores de lesões cutâneas irão desenvolver a forma mucosa. Sabe-se que a demora na cicatrização da lesão

primária e o tratamento inicial inadequado podem estar associados com a evolução da doença, inicialmente cutânea, para essa forma tardia. Na maioria dos casos, a leishmaniose mucosa (LM) manifesta-se na mucosa nasal, com importante comprometimento do septo nasal, seguindo-se, em ordem de frequência, o envolvimento da mucosa oral (Marsden 1986; Pearson & Sousa 1996, Soong et al. 2012).

Entre as formas menos comuns de LTA encontram-se a leishmaniose cutânea difusa (LCD), que apresenta lesões nodulares, ricas em parasitos, que não cicatrizam espontaneamente e são difíceis de tratar e a forma cutânea disseminada (LD), que é caracterizada por múltiplas lesões ulceradas (mais de dez) distribuídas por diversas áreas do corpo, em decorrência da disseminação dos parasitos por via hematogênica ou linfática (Convit & Kerdel-Vegas 1965; OMS 1990; Costa et al. 1992; Turetz et al. 2002; Pereira et al. 2009; Goto & Lindoso 2010).

1.3 Imunologia da Leishmaniose Tegumentar Americana

A entrada da leishmânia no organismo desencadeia, primeiramente, a resposta imune inata do hospedeiro. Inicialmente, no local de inoculação das formas promastigotas desenvolve-se uma resposta inflamatória aguda inespecífica da qual participam o sistema complemento, os neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos e células NK (*Natural Killer*), resultando na fagocitose do parasito pelos neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas. A glicoproteína 63 (gp63) e os glicolipídios lipofosfoglicanos (LPG) são importantes para a interação dos parasitos com os macrófagos. As formas infectantes do parasito podem ativar diretamente o sistema complemento e também se ligar a anticorpos naturais e ativar a via clássica do sistema complemento e, conseqüentemente, a cascata lítica. Ao serem gerados fragmentos da cascata (C3b e C3bi), estes se depositam na membrana do parasito e ligam-se aos receptores dos macrófagos (CR1 e CR3), facilitando a fagocitose do parasito (Dominguez et al. 2003; Brasil 2006; Silveira et al. 2009).

Os receptores similares à Toll (TLRs, *toll-like receptors*) são receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs), relevantes para a imunidade inata contra a leishmânia e outros parasitos. Além de TLRs, outros exemplos de PRRs incluem receptores com domínio de oligomerização de nucleotídeos (NOD)

intracelulares e receptores de varredura (*scavenger receptors*). A ativação de TLRs por PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) induz a produção de citocinas inflamatórias e respostas antimicrobianas por células imunes inatas (Birnbbaum & Craft 2011). O TLR2 é ativado por LPG de *Leishmania spp*, um agonista de TLR2 que estimula a produção de interferon gama ($\text{IFN}\gamma$), fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) e a translocação nuclear do fator de transcrição NF κ B em células NK humanas (Becker et al. 2003; de Veer et al. 2003). A ativação de TLR2 por LPG e proteofosfoglicano, purificados de *L. major*, induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), $\text{IFN}\gamma$ e interleucina 12 (IL-12) em culturas de células mononucleares do sangue periférico humano, sugerindo que o TLR2 parece ser importante para a geração de uma resposta imune celular eficaz (Kavoosi et al. 2009). Em seres humanos, na LCL causada por *L. (V.) braziliensis*, o TLR2 é o mais comum TLR expresso, principalmente por macrófagos presentes nas lesões durante a doença ativa (Tuon et al. 2012). O TLR4 é ativado na infecção por *L. major* e é associado com o aumento da atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), a qual utiliza o aminoácido L-arginina para a produção de óxido nítrico (NO), que é uma das principais moléculas leishmanicidas. Contudo, não se conhece os ligantes de TLR4 na leishmânia (Kropf et al. 2004). Formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* ativam TLR4 em monócitos humanos pré-sensibilizados com $\text{IFN}\gamma$, induzindo $\text{TNF}\alpha$ e IL-10 (Galdino Jr et al. 2016). Foi observada a expressão de TLR9 em macrófagos presentes em granulomas na derme de pacientes com LC, sugerindo que a expressão deste receptor pode ser importante para a formação do granuloma e para o controle do parasito (Tuon et al. 2010). Notou-se elevada expressão de TLR9 quando as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LC, decorrente de infecção com *L. (V.) braziliensis*, foram submetidas a uma cultura com antígeno solúvel de *Leishmania* e quando comparado com os indivíduos não infectados na presença do estímulo. A expressão deste receptor correlacionou-se, positivamente, com o tamanho da lesão nos pacientes. Houve aumento, também, na expressão de CD16 e $\text{TNF}\alpha$ nos monócitos infectados e diminuição na expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 (Gollob et al. 2014).

Os neutrófilos são, rapidamente e massivamente, recrutados para o local de inoculação de *Leishmania*, onde fagocitam os parasitos (Charmoy et al. 2010), que podem sobreviver dentro destas células, evitando a geração das tóxicas espécies

reativas de oxigênio (ROS) (Laufs et al. 2002) e se dirigindo para compartimentos não líticos, como reportado na infecção por *L. donovani* (Gueirard et al. 2008). A fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos e células dendríticas (DCs) após infecção com *L. major* pode limitar a ativação dos macrófagos e DCs, levando a uma melhor sobrevivência do parasito (Van Zandbergen et al. 2004; Afonso et al. 2008; Laskay et al. 2008). No entanto, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* são mortos por redes extracelulares de neutrófilos (NETs) (Guimaraes-Costa et al. 2009). A função dos monócitos na leishmaniose será descrita mais abaixo. As DCs são células fagocíticas mononucleares capazes de fagocitar e transportar antígenos de *Leishmania* para os linfonodos onde ocorre o processamento e apresentação deles aos linfócitos T virgens, os quais geram células T efetoras importantes para o combate à infecção (Garg et al. 2007; Soong 2008).

Nos pacientes com LTA, a ativação dos linfócitos T auxiliares (Th) gera uma mistura das respostas Th1 e Th2. Os pacientes com LCL apresentam resposta imune humoral, bem como, uma boa resposta imune celular contra *Leishmania*, esta última sendo avaliada por intradermoreação de Montenegro (IDRM), que é um teste cutâneo de hipersensibilidade tardia para antígenos de *Leishmania*. O perfil Th1 (produção de IFN γ), geralmente, predomina em relação ao Th2 (produção de IL-4) (Cáceres-Dittmar et al. 1993; Convit et al. 1993; Pirmez et al. 1993; Vega Lopez 2003; Silveira et al. 2009). Durante a doença ativa há uma mistura de respostas Th1 e Th2, mas a cura clínica é associada a uma resposta Th1 sustentada, caracterizada por níveis elevados de IFN γ e diminuição da produção de IL-4 e de IL-10 (Castellano et al. 2009). As células mononucleares de pacientes que obtiveram cura espontânea respondem a antígeno de *L. major*, produzindo elevados níveis de IFN γ e TNF α e baixos de IL-10 (Kemp et al. 1999). Os pacientes com LCL resistentes ao tratamento, apresentam uma elevada expressão de IL-10 nas suas lesões, sugerindo que essa citocina pode favorecer a infecção (Bourreau et al. 2001). Na LCL, a iNOS está presente nas lesões, sendo relacionada à expressão de interleucina 12 (IL-12), IFN γ e à presença de poucos parasitos (Qadoumi et al. 2002; Diaz et al. 2006; Morgado et al. 2008). A elevada produção de IFN γ ativa os macrófagos para matar o parasito intracelular, induzindo a liberação de NO (Green et al. 1990; Liew et al. 1990). Macrófagos humanos produzem NO e destroem *L. major* na presença de TNF α (Vouldoukis et al. 1997). Outro mecanismo responsável

pelo controle dos parasitos leishmânia é a produção de ROS, gerada pela explosão respiratória que ocorre durante a fagocitose. Monócitos humanos e de camundongos produzem elevados níveis de ROS e podem mediar a morte de *Leishmania*, sem ativação prévia (Gonçalves et al. 2011; Novais et al. 2014).

A resposta imune na LD é caracterizada por uma inibição incompleta da hipersensibilidade mediada por linfócitos T, mas com evidente supremacia da resposta imune Th1 sobre a Th2; havendo uma elevada produção de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ tanto no sangue quanto no tecido (Silveira et al. 2009; Carvalho et al. 2012). Os pacientes apresentam lesões com poucos parasitos e uma resposta imune celular, que associada ao tratamento, pode levar à cura clínica (Coupié et al. 2004; Machado et al. 2011).

Na LCD, associada com *L. (L.) amazonensis*, os pacientes apresentam predomínio do perfil Th2 de resposta imune, que embora controle a extensa destruição tecidual, promove o crescimento do parasito, pois ativa os macrófagos para vias de reparo tecidual, com aumento de produção de poliaminas. Há concentrações substanciais de IL-4, IL-5 e $\text{TNF}\alpha$ no soro e baixas concentrações de $\text{IFN}\gamma$ e IL-12. A LCD também é associada a elevados títulos de anticorpos e de IL-10 (Iniesta et al. 2002; Reithinger 2007; Scott & Novais 2016). Os pacientes apresentam anergia aos antígenos de leishmânia, com resposta negativa na IDRM e linfócitos não responsivos em ensaios *ex vivo* (Brasil 2006; Reithinger et al. 2007; Silveira et al. 2009).

Na forma mais grave da LTA, a LM, relacionada a parasitos do subgênero *Viannia*, a maioria dos pacientes apresentam forte resposta imune celular, associada à destruição tecidual. A resposta na IDRM é, em geral, mais forte do que a de pacientes com LCL. A maioria dos linfócitos apresenta perfil Th1, havendo elevada expressão de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ nas lesões, o que pode ser acompanhado ou não da expressão de IL-4, geralmente negativa (Cáceres-Dittmar et al. 1993; Convit et al. 1993; Pirmez et al. 1993; Amato et al. 2003; Silveira et al. 2004; Silveira et al. 2009). As células mononucleares de pacientes com LM respondem a antígenos de *L. (L.) amazonensis*, produzindo maiores quantidades de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ do que as de pacientes com LC e, após o tratamento, o nível de $\text{TNF}\alpha$ foi reduzido em 60% dos pacientes, sugerindo um papel para esta citocina na imunopatologia da LM (Bacellar 2002). Há citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 nas lesões, porém a expressão

do receptor para esta citocina encontra-se diminuída e isto parece ser responsável pela falta de controle do processo inflamatório pela IL-10 (Faria et al. 2005). A expressão da enzima iNOS nas lesões de pacientes com LCM é semelhante àquela de pacientes com LCL (Diaz et al. 2006). Um desequilíbrio na produção de $TNF\alpha$ /IFN γ e IL10 é descrito na LM, mas não na LCL (Gaze et al. 2006; Gomes Silva et al. 2007).

Recentemente, com a descrição de novos perfis de linfócitos Th, os linfócitos Th17 vêm sendo avaliados na LTA. A IL-6, produzida por uma grande variedade de tipos celulares, como os macrófagos e monócitos ativados é capaz de ativar células T, atrair neutrófilos aos sítios de infecção e, juntamente com TGF β ou IL-1 β , influenciar o desenvolvimento do perfil Th17 (Acosta-Rodriguez et al. 2007; Assier et al. 2010; Kimura & Kishimoto 2011). As células Th17 foram inicialmente relacionadas à indução de doenças autoimunes e inflamação tecidual, sendo capazes de produzir principalmente IL-17A e IL-17F (Basso et al. 2009). Este perfil pode levar à exacerbação da leishmaniose ou à proteção contra a doença. A resposta imune inadequada contra *L. (L.) amazonensis*, que resulta em infecção crônica no camundongo, tem sido associada com a indução de linfócitos T CD4⁺ que produzem níveis elevados de IL-17 (Xin et al. 2007). Foi também observado, em estudos utilizando camundongos BALB/c deficientes em IL-17, que estes desenvolveram lesões menores (causadas por *Leishmania major*) e com menos parasitos do que os do tipo selvagem (Lopez Kostka et al. 2009). Um estudo usando uma vacina constituída por *L. major* viva e CpG DNA protegeu os camundongos C57BL/6 contra *L. major*, o que foi associado com a indução específica de células Th17 (Wu et al. 2010). Estudos, em seres humanos, demonstram um papel no controle da infecção por células Th17, já que a IL-17 e a IL-22 foram fortemente correlacionadas com a proteção contra a leishmaniose visceral (Pitta et al. 2009). Em um estudo com células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes com LC, LM e indivíduos com infecção subclínica foi notada maior produção de IL-17 nos indivíduos com a forma subclínica da leishmaniose, sugerindo que essa citocina possa estar envolvida na proteção contra a infecção por *L. (V.) braziliensis* (Oliveira 2012). Ainda, elevados níveis das citocinas TGF- β , IL-1 β , IL-23 e IL-6 relacionadas às células Th17, em áreas de dano tecidual com infiltrado neutrofílico na infecção por *L. (V.) braziliensis*, tem sido demonstrados (Boaventura et al. 2010).

Durante as respostas imunes aos parasitos, os linfócitos T reguladores (Treg) possuem enorme importância, ao impedirem as respostas imunes exacerbadas, e são dependentes, principalmente, de IL-10 e TGF β (Hawrylowicz 2005; Mucida & Cheroutre 2007). As células Treg CD4⁺CD25⁺ estão envolvidas no controle da infecção por *L. major*. Em camundongos suscetíveis, elas suprimem a excessiva resposta Th2, enquanto que, em camundongos geneticamente resistentes, elas controlam as respostas protetoras Th1, permitindo a sobrevivência do parasito e a manutenção da memória imunológica (Belkaid 2003). As células Tregs, capazes de produzir IL-10 e/ou TGF β , foram investigadas na leishmaniose humana e identificadas nas lesões de pacientes com LCL causada por *L. (V.) braziliensis*, ajudando no controle da doença (Campanelli et al. 2006).

1.4 Os monócitos na leishmaniose

Os monócitos são células que circulam pelo sangue e, ao migrarem para os tecidos diferenciam – se em macrófagos ou em DCs. São subdivididos em três subpopulações, de acordo com os marcadores de membrana, CD14 (co-receptor do TLR4) e CD16 (receptor para a porção Fc de imunoglobulina G) em: clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14^{low}CD16⁺) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Os monócitos clássicos (que compreendem 90% dos monócitos) exercem, principalmente, atividades tais como fagocitose, reparo tecidual e a anti-apoptose. Os monócitos intermediários são os melhores na capacidade de apresentação de antígenos para os linfócitos T. Já os monócitos não clássicos possuem elevada capacidade de fagocitose, propriedades anti-proliferativas e pró-apoptóticas e produzem maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias, dependendo do estímulo usado (Cros et al. 2010; Wong et al. 2011; Zawada et al. 2011; Abeles et al. 2012). A produção de citocinas por monócitos é, eficientemente, gerada por estimulação com produtos bacterianos, como LPS (agonista de TLR4) ou Pam₃Cys (lipopeptídeo agonista de TLR2). O reconhecimento destes agonistas envolve os receptores TLRs e CD14, presentes na superfície dos monócitos (Blumenstein et al. 1997).

Na defesa contra *Leishmania*, os monócitos e os macrófagos, desempenham um papel importante na fagocitose de formas promastigotas e amastigotas. Como resposta ao contato com o parasito, os monócitos produzem IL-12 (Gorak, Engwerda

et al. 1998) e induzem a produção de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ por linfócitos Th1 (Belkaid, Butcher et al. 1998; D'oliveira, Machado et al. 2002), que aumentam a atividade dos macrófagos infectados, induzindo a morte da leishmânia, por estimular a produção de NO e ROS (Liew, Parkinson et al. 1990; Nathan & Hibbs 1991).

Foi descrito um aumento da expressão de CD16 nos monócitos de pacientes com LCL. Estes monócitos CD16^+ parecem participar da imunopatogenia da doença (Soares et al. 2006). Os monócitos CD16^+ estão em maior quantidade na fase pré-ulcerativa da doença, sugerindo que eles podem aumentar a resposta inflamatória. Os monócitos intermediários e não clássicos tem a frequência aumentada na LCL e a subpopulação dos intermediários, que expressa o receptor CCR2, pode contribuir para a doença, uma vez que, responde mais à quimiocina CCL2, a qual é altamente expressa nas lesões cutâneas e atrai os monócitos para a lesão. *In vitro*, esta subpopulação foi a única que produziu $\text{TNF}\alpha$ em resposta ao antígeno de *Leishmania*, o que indicou que estes monócitos, *in vivo*, podem migrar para o local da infecção e colaborar com a inflamação e formação das lesões (Passos et al. 2015). As três subpopulações de monócitos são similarmente infectadas por *L. (V.) braziliensis*, mas somente os monócitos clássicos conseguem impedir a replicação destes parasitos, por meio da produção de ROS (Novais et al. 2014).

Para avaliar se os monócitos de indivíduos com LC secretavam $\text{TNF}\alpha$ em culturas de curto período de tempo, PBMCs foram estimuladas com antígeno solúvel de leishmânia (SLA) ou monócitos isolados foram infectados com formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Após 8 h de cultura, os monócitos secretaram, significativamente, mais $\text{TNF}\alpha$ do que as células T CD4^+ ou T CD8^+ (Costa 2012), mostrando que os monócitos são os melhores produtores de $\text{TNF}\alpha$ de forma rápida em culturas. Ainda, as PBMCs de pacientes com LC ou com LM foram comparadas *ex vivo*, após cultura com SLA. Os resultados mostraram que nos indivíduos com LC houve uma correlação positiva entre a frequência de monócitos produzindo $\text{TNF}\alpha$ e IL-10; enquanto que os pacientes com LM não apresentaram correlação positiva, sugerindo que em pacientes com LC o processo inflamatório é mais controlado do que na LM e que os monócitos podem ser importantes no controle da resposta inflamatória *in vivo* durante a leishmaniose (Gaze et al. 2006).

Como referido acima, os monócitos podem ser ativados por agonistas de TLRs e NLRs. O LPS e Pam₃Cys, agonistas de TLR4 e TLR2, respectivamente, tem

sido bastante utilizados para avaliar a ativação de monócitos (Farina et al. 2004; Brunialti et al. 2006). O MDP (muramildipeptídeo) é o produto de degradação do peptídeoglicano na maioria das bactérias gram-positivas e algumas gram-negativas, sendo um agonista específico de NOD2 (Sun & Ding 2012) e estimula macrófagos, monócitos e DCs (Wardowska et al. 2013). Os efeitos de treinamento imune de monócitos por BCG podem ser reproduzidos com MDP, mas não com Pam₃Cys ou LPS (Kleinnijenhuis et al. 2012), mostrando que o MDP é um importante componente do BCG na ativação de monócitos. O MDP exerce efeitos sinérgicos com vários PAMPs agonistas de TLR em células monocíticas humanas. Foi observado um sinergismo entre Pam3CSSNA (agonista de TLR2) e MDP ou FK565 (agonista de NOD1) para a indução de interleucina 8 (IL-8) em células monocíticas THP-1 *in vitro*. Os receptores NOD2 e NOD1 reconhecem, respectivamente, MDP e desmuramilpeptídeos, que agem sinergicamente com os agonistas de TLR (Uehara et al. 2005). Células musculares lisas de artéria coronária humana foram estimuladas com MDP sozinho ou em combinação com Pam ou LPS e foi observado que o MDP, em combinação com estes agonistas de TLR, foi mais potente para estimular a proliferação das células musculares e a secreção de IL-8 e TNF α do que cada um dos estímulos sozinhos (Sun & Ding 2012).

O MDP e o FK565, em combinação com lipídeo A (agonista de TLR4), poly I:C (agonista de TLR3) ou CpG DNA (agonista de TLR9), mas não com Pam3CSSNA (agonista de TLR2) induziram, sinergicamente, a produção de IL-12 em DCs humanas em cultura e esta citocina, por sua vez, promoveu a produção de IFN γ por linfócitos T (Tada et al. 2005). O MDP exerce efeitos sinérgicos notáveis com LPS para a produção de citocinas inflamatórias em cultura de células monocíticas humanas THP-1 e U937. A regulação da expressão de MyD88 por MDP, via sinalização NOD2, seguida pela ativação de NF-kB, pode ser parcialmente responsável pelos efeitos sinérgicos (Yang et al 2001).

No item 1.3 foi descrita a participação do TLR2 na leishmaniose. Camundongos deficientes em NOD2 (Nod2^{-/-}) e em RIP2 (Rip2^{-/-}) apresentam defeito na resposta Th1, aumento de Th17 e maiores cargas parasitárias comparados a camundongos selvagens (WT) infectados com *L. infantum chagasi*. Estes dados mostram que a via de NOD2-RIP2 desempenha um papel importante na modulação da resposta imune adaptativa e promove a proteção contra leishmaniose visceral (Nascimento et al. 2016). Desta forma, é sugerida a

participação dos receptores NLRs na resposta imune inata induzida por leishmânia. Além de NOD2, a ativação do inflamassoma de NLRP-3 mostrou-se crítica para o controle da replicação de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. infantum chagasi in vivo*, em um modelo experimental. Isso ocorreu devido à produção de IFN γ e ao processamento de IL-1 β , que culminaram com aumento na expressão de iNOS, enzima relacionada com a restrição da replicação de *Leishmania* em macrófagos, mediada pela produção de NO (Lima-Júnior et al. 2013).

Os estudos sobre a ativação de monócitos e a produção de citocinas por estas células durante a LTA são escassos. Nosso grupo tem avaliado estas células (Pereira 2012; Veras 2015). No presente estudo, foi avaliada a ativação de monócitos em hemoculturas com agonistas de TLR4 (LPS), TLR2 (Pam3Cys) e de NOD2 (MDP), bem como, com antígeno de *L. (V.) braziliensis*, verificando a produção das citocinas TNF α , IL-6 e IL-10. A produção de citocinas por monócitos tem sido avaliada em hemoculturas, culturas de PBMC ou monócitos purificados. Neste trabalho, a técnica escolhida foi a hemocultura, por possibilitar a análise dos monócitos do sangue sob mínimas condições de alteração funcional, já que eles podem apresentar alterações quando técnicas de purificação são utilizadas (Damsgaard et al. 2009).

1.5 Diagnóstico e Tratamento da leishmaniose tegumentar americana

O diagnóstico da LTA abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (Gontijo & Carvalho 2003). Deve-se diferenciar as formas cutâneas da LTA de esporotricose, tuberculose cutânea, carcinoma basocelular, ectima, eritema endurecido de Bazin, impetigo, anemia falciforme, paracoccidioidomicose, dermatite artefacta ou patomímia e hanseníase virchowiana. O diagnóstico diferencial da forma mucosa é feito com paracoccidioidomicose, neoplasias (carcinoma epidermóide, carcinoma basocelular, granuloma médio facial e outros linfomas), rinoscleroma, rinosporidiose, entomofotoromicose, hanseníase virchowiana, sífilis terciária, perfuração do septo nasal traumática ou por uso de drogas, rinite alérgica, sinusite e granulomatose de Wegner (Brasil 2006).

O exame laboratorial mais simples, e por essa razão, geralmente, o primeiro a ser realizado, é a pesquisa direta das formas amastigotas em material obtido da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia da borda da lesão, corado pelo Giemsa

ou Leishman (Exame Direto). O diagnóstico histopatológico de certeza só é possível mediante o achado dos parasitos. Caso contrário, as alterações histopatológicas são apenas sugestivas do diagnóstico (Gontijo & Carvalho 2003). Associado a imunoistoquímica, o diagnóstico no exame histopatológico tem sua sensibilidade aumentada (Oliveira et al. 2010).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um exame que permite amplificar, em escala exponencial, seqüências de DNA do parasito. É capaz de detectar quantidades mínimas quanto um fentograma do DNA de leishmânia, por isto, é um teste sensível para detecção do parasito em material usado no Exame Direto ou biópsias das lesões. No entanto, as exigências técnicas e o custo elevado limitam seu emprego rotineiro (Brujin & Barker 1992).

A IDRM constitui um valioso recurso diagnóstico nos casos em que os parasitos são escassos ou ausentes, sendo também muito útil nos inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas. A técnica consiste na injeção na face flexora do antebraço de 0,1 mL de antígeno, intradermicamente, e a reação é considerada positiva quando, na leitura após 48 ou 72 horas, observa-se uma enduração igual ou superior a 5 mm. O teste se torna positivo em torno de quatro meses após o início da lesão cutânea, mas não diferencia doença atual e pregressa (na maioria das vezes permanece positivo por vários anos após o tratamento), nem distingue doença de infecção e é, geralmente, negativo na LCD e nos pacientes imunossuprimidos (Montenegro 1926; Shaw & Lainson 1975).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), inicialmente proposta para diagnóstico e, subsequentemente, para controle de cura (após tratamento e cura clínica os títulos de anticorpos diminuem), é o método sorológico mais usado. Apresenta sensibilidade de 71% nos pacientes com formas cutâneas e de 100% naqueles com a forma mucosa. Usualmente, a RIFI é negativa na LCD e em pacientes com lesões recentes (até seis meses de evolução) e detecta títulos mais elevados de anticorpos em pacientes com várias lesões (Mendonça et al. 1988; Gontijo & Carvalho 2003).

O medicamento de primeira escolha para o tratamento da LTA é o antimonial pentavalente (Ashford 2000; Gontijo & Carvalho 2003). Nas formas cutâneas localizadas e disseminadas a dose varia entre 10 a 20 mg/Sb⁺⁵/Kg/dia, durante 20 dias seguidos, aplicados via intramuscular ou endovenosa. Se não houver cicatrização completa três meses após o término do tratamento, o esquema deverá

ser repetido, prolongando-se, desta vez, a duração da série para 30 dias. Persistindo o insucesso terapêutico, deve ser utilizado um dos medicamentos de segunda escolha, especialmente a Anfotericina B. Na LCD, a dose é de 20 mg/Sb⁺⁵/Kg/dia, durante 20 dias seguidos. Na LM, a dose recomendada é de 20 mg/Sb⁺⁵/Kg/dia, durante 30 dias consecutivos e se não houver cicatrização completa três meses após o término do tratamento, o esquema deverá ser repetido apenas uma vez e os pacientes devem utilizar um dos fármacos de segunda escolha (Gontijo & Carvalho 2003; Brasil 2006).

Os antimoniais pentavalentes apresentam potencial toxicidade cardíaca, hepática, pancreática e renal, devendo ser utilizados com cautela, e sob monitoramento clínico e laboratorial. Nos pacientes com nefropatias, bem como em gestantes, a anfotericina B é o fármaco de primeira escolha para a realização do tratamento (Brasil 2006).

O critério de cura é clínico, sendo necessário acompanhamento mensal por três meses seguidos e, após a cura clínica, seguimento até 12 meses após o fim do tratamento. O critério de cura clínica da LC é estabelecido pelo aspecto das lesões: reepitelização, regressão total da infiltração e eritema, até três meses após o término do tratamento. E da LM é definido pela regressão dos sinais e sintomas e comprovação pelo exame otorrinolaringológico, até seis meses após a conclusão da terapia (Montenegro 1926; Brasil 2006).

2 JUSTIFICATIVA

A LTA constitui um sério problema de saúde pública no Brasil. É uma doença, cuja forma clínica depende das interações parasito-vetor-hospedeiro, variando desde uma única lesão a lesões múltiplas na pele, até lesões mucosas desfigurantes. Apesar dos vários estudos sobre a imunologia desta doença, ainda não estão definidos os mecanismos que levam ao controle ou à persistência dos parasitos, principalmente com relação à infecção causada por *L. (V.) braziliensis*, que é a espécie mais prevalente no nosso meio e que causa a forma clínica mais grave da LTA, a LM. Pouco se sabe sobre a ativação dos monócitos durante a LTA. Os monócitos são células circulantes que se diferenciam em macrófagos nos tecidos, portanto, seu grau de ativação no sangue periférico pode interferir no estado de ativação dos macrófagos que serão gerados nas lesões da LTA. Os monócitos podem ser ativados por diferentes receptores inatos, incluindo TLRs e NLRs e, após ativação, secretam citocinas pró- e anti-inflamatórias, tais como $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e IL-10. A avaliação do perfil de resposta dos monócitos após o acionamento de TLRs e NOD2 poderá contribuir para uma compreensão sobre o estado de ativação dos monócitos e sua participação na imunopatogenia e no controle da LTA.

3 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1 GERAL: Avaliar o perfil de resposta de citocinas produzidas por monócitos de pacientes com LTA em hemoculturas, após ativação com agonistas de TLRs e NOD2.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF α) e anti-inflamatória (IL-10) em hemoculturas de pacientes com LCL e de controles saudáveis, após ativação com agonistas de receptores similares à *Toll* (TLR) ou de receptores NOD2.
- Verificar se a ativação celular com agonistas de TLR2 e de NOD2 ou com antígenos de *Leishmania* e agonista de NOD2 tem efeitos aditivos ou sinérgicos na produção de citocinas em hemoculturas de pacientes e controles.
- Correlacionar os dados clínicos observados ao diagnóstico dos pacientes com LCL com as concentrações das citocinas IL-6, TNF α e IL-10 produzidas nas hemoculturas desses pacientes.
- Avaliar o papel das citocinas IL-6, TNF α e IL-10 na resposta ao tratamento dos pacientes com LCL, comparando a produção destas citocinas nas hemoculturas dos pacientes clinicamente curados com um ciclo de tratamento com a daqueles curados com mais de um ciclo de tratamento.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos, critérios de inclusão e diagnóstico de LTA: O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas, protocolo CAAE 59615915.4.0000.5078 (PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA, ANEXO 1). Foram avaliados 29 pacientes (LCL) e 29 indivíduos controles (Doadores do Banco de Sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia), que foram pareados por gênero e idade, sendo que todos leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, ANEXO 1) antes de doarem o sangue. Foram incluídos pacientes diagnosticados com LTA (dados epidemiológicos e exames clínicos associados com a positividade de um dos exames laboratoriais: IDRM, análises histopatológicas com detecção de formas amastigotas confirmadas por imunoistoquímica, reação da polimerase em cadeia (PCR, Polymerase Chain Reaction) mkPCR, e RIFI), antes do início do tratamento para essa doença ou pacientes já tratados que necessitaram de mais ciclos de medicamento. Foram excluídos pacientes com idade inferior a 18 anos e superior a 65 anos e aqueles com história de uso da medicação específica nos últimos três meses. Os pacientes foram atendidos no ambulatório de Endemias/HDT (Hospital Anuar Auad, centro de referência de leishmanioses no Estado de Goiás) para diagnóstico clínico, obtenção de biópsia, tratamento e acompanhamento.

4.2 Colheita de dados clínicos e laboratoriais: Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos durante as consultas médicas, mediante o preenchimento de um questionário (FICHA DOS PACIENTES, ANEXO 2) sobre os dados pessoais, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.

4.3 Tratamento e acompanhamento dos pacientes, critérios de cura e gravidade: Após o diagnóstico, os pacientes foram tratados, sendo o fármaco de primeira escolha, o antimonial pentavalente (antimoniato de N-metil glucamina, Glucantime, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil; 10 a 20 mg/kg/dia/20 dias (LC) e 20 mg/kg/dia/30 dias (LM)) e de segunda escolha, a anfotericina B (Cristália, São Paulo, Brasil; dose total de 1.500 mg). Foram considerados curados clinicamente os pacientes com cicatrização das lesões, associada com negatificação de RIFI depois

de seis (LC) ou 12 (LCM) meses de acompanhamento. Os pacientes não curados foram aqueles com persistência das lesões e/ou RIFI com título > que 40. Os critérios para gravidade da doença foram o tamanho das lesões, número de lesões, tempo de evolução das lesões e IDRM não reagente após três meses de doença.

4.4 Obtenção dos antígenos de *L. (V.) braziliensis*: A cepa MHOM/BR/2003/IMG (IMG3) foi cultivada, por seis dias, em meio Grace (Grace's Insect Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Cripion, Andradina, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 11 mM de bicarbonato de sódio (Merck), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma). Em seguida, as formas promastigotas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) por três vezes, centrifugando a 1000 g por 15 min, a 4° C e ressuspendidas em PBS contendo inibidores de proteases (coquetel de inibidores de proteases, Sigma-Aldrich). Os parasitos foram rompidos por cinco ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho maria a 37° C). A quantidade de proteínas foi dosada usando o BCATM *protein assay kit* (Pierce, Rockford, IL, EUA), usando soro albumina bovina para estabelecer a curva padrão, sendo todos os procedimentos realizados de acordo com as instruções do fabricante. Os antígenos (Ag) foram estocados na concentração de 2,5 mg/mL (-80°C) e usados na concentração de 50 µg/mL nas hemoculturas.

4.5 Colheita de sangue e hemoculturas: O sangue periférico (10 mL) de indivíduos controles e pacientes (ao diagnóstico) foi colhido em tubos vacutainer, contendo solução de heparina como anticoagulante (BD Vacutainer TM, Juiz de Fora, MG, Brasil). Para avaliar a produção de citocinas, foram realizadas hemoculturas, de sangue diluído a 1/3 em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 11 mM de bicarbonato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Todos estes reagentes eram da Sigma. As hemoculturas foram incubadas na ausência ou presença de LPS (de *E. coli* 0111:B4, Sigma, 100 ng/mL), Pam₃Cys SKKKK (EMC, Tubingen, Alemanha, 100 ng/mL), antígenos dos parasitos (50 µg/mL) ou MDP (Sigma; 5 µg/mL ou 10 µg/mL). Após incubação a 37°C, em termobloco, os tubos (2 mL, livres de endotoxina, Axygen, Califórnia, EUA), hermeticamente fechados, foram centrifugados por 10 min à 600xg,

4°C; sendo colhidos os sobrenadantes para avaliação da liberação de TNF α e/IL-6 (6 h) e IL-10 (24 h).

4.6 Avaliação das citocinas: O TNF α e a IL-10 foram quantificados nos sobrenadantes das culturas por ensaio imunoenzimático (ELISA), preparado no laboratório. Os hibridomas B 154.7 e B 154.9, que reconhecem TNF α , e os hibridomas JES907 e B27, que reconhecem IL-10, doados pelo Dr. Giorgio Trinchieri (NCI, Bethesda, EUA), foram cultivados em meio RPMI completo e os anticorpos foram purificados dos sobrenadantes das culturas, por uso de coluna de proteína G, de acordo com o fabricante. A concentração proteica foi determinada pelo kit BCA Protein Assay (Pierce), com uso de uma curva padrão com concentrações conhecidas de gamaglobulina. As placas foram sensibilizadas com os anticorpos anti-TNF α ou anti-IL-10 (1 μ g/mL) e após bloqueio (PBS 1x com 3% de SFB) das placas, foram adicionados os sobrenadantes das hemoculturas. Após incubação e lavagens, foram adicionados os anticorpos conjugados com biotina (1 μ g/mL). Após incubação (T.a.) e lavagens, foi acrescentado o conjugado estreptoavidina-peroxidase (Sigma; 1:2000) e, após incubação (T.a.) e lavagens, a solução substrato ortofenilenodiamina (OPD, Sigma, 5 mg) e peróxido de hidrogênio 1:1000, diluídos em tampão citrato-fosfato pH 5,0. A reação foi finalizada com solução de ácido sulfúrico 2 N e a densidade óptica (DO) obtida em um leitor de microplacas (Multiskam, Thermo Labsystems) com filtros de 450 nm e 620 nm. As concentrações do TNF α e da IL-10 foram determinadas de acordo com as curvas padrões preparadas com as citocinas recombinantes (R&D System, Mineápolis, MN, EUA).

A IL-6 foi quantificada nos sobrenadantes das hemoculturas, por ELISA, usando kit comercial Peprotech (Rocky Hill, NJ, EUA), de acordo com as instruções dos fabricantes.

Os resultados foram expressos em pg/mL. Os limites de detecções foram: 15 pg/mL de TNF, 20 pg/mL de IL-10 e 15 pg/mL de IL-6.

4.7 Análises estatísticas: Os dados foram apresentados como valores individuais, medianas e interquartis, utilizando testes não paramétricos para as análises (Wilcoxon para amostras pareadas e Mann Whitney para amostras não pareadas). Testes de correlação Spearman também foram usados para avaliação da correlação

entre os dados clínicos e experimentais. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o GraphPadPrism 4.0 Software Inc. (San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Características dos pacientes com Leishmaniose cutânea localizada

Foram avaliados 29 pacientes com LCL, pareados por gênero e idade com controles saudáveis. Os pacientes eram, em sua maioria (75,9%), pertencentes ao sexo masculino e relataram ter contraído a doença nos estados de Goiás (n = 13), Mato Grosso (n = 6), Pará (n = 1), Tocantins (n = 3), Acre (n = 1) e Maranhão (n = 1). De quatro pacientes esta informação não foi obtida. A Tabela 1 mostra uma elevada heterogeneidade nos dados clínicos dos pacientes. Estes apresentavam de uma a 20 lesões (mediana: 1); com tamanho destas variando entre 0,3 e 8 cm (mediana: 3 cm) e tempo de evolução variando entre um e 12 meses (mediana: 4 meses). Não foram detectadas diferenças significantes entre os números de leucócitos ou monócitos do sangue periférico de pacientes e controles. Em relação aos testes diagnósticos, 67,8% dos pacientes apresentaram exame histopatológico positivo; 68% apresentaram soro reagente na RIFI; 68,2% apresentaram teste intradérmico positivo e 83,3%, PCR positiva para *Leishmania (Viannia) sp.*

Tabela 1. Características de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada e de controles.

Características	Paciente	Controle
Sexo masculino	22 / 29	22 / 29
Sexo feminino	7 / 29	7 / 29
Idade (anos)	43 (18 – 65) ^a	40 (28 – 52)
Leucócitos (/ mm ³) ^b	6600 (4100 – 9800)	6320 (4200 - 11760)
Monócitos (%) ^c	4,2 (0,3 – 7,9)	0,5 (0,4 – 6,1)
Monócitos (/ mm ³) ^d	17,9 – 529,3	22,3 – 256,2
Número de lesões ^e	1 (1 – 20)	-
Tamanho das lesões (cm) ^f	3 (0,3 – 8)	-
Tempo de lesão (meses) ^g	4 (1 – 12)	-
IDRM (mm) ^h	10 (3 – 28)	-
Resultados de testes diagnósticos positivos % (positivos / total testado)		
IHC ⁱ	67,8 (19 / 28)	
RIFI ^j	68 (17 / 25)	
IDRM	68,2 (15 / 22)	
PCR ^k	83,3 (15 / 18)	

Tabela 1. 29 pacientes com LCL foram atendidos no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad (Goiânia, Goiás, Brasil) e 29 controles foram obtidos de doadores de sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (Goiânia, Goiás, Brasil). ^aMediana (mínimo - máximo). ^{b, c}, ^d(14 pacientes e 8 controles). ^dMínimo – máximo. ^{e, g}(28 pacientes). ^f(25 pacientes). ^hIDRM: Intradermorreação de Montenegro (15 pacientes). ⁱIHC: Exame histopatológico com imunohistoquímica para amastigotas. ^jRIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta. ^kPCR: Reação em cadeia da polimerase.

5.2 Avaliação da produção de citocinas pró- e anti-inflamatória em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada

A fim de avaliar a produção de citocinas *ex vivo* de pacientes com LCL, foram colhidas amostras de sangue periférico desses pacientes ao diagnóstico, assim como de doadores saudáveis, e incubadas com meio de cultura, LPS (agonista de TLR4), Pam (agonista de TLR2), Ag (antígeno total de leishmânia) ou MDP (agonista de NOD2). Após 6 ou 24 horas de incubação, foram dosadas as citocinas. Nas hemoculturas dos pacientes e dos controles, houve produção significativa de IL-6 após estimulação com LPS, Pam, Ag ou MDP ($p < 0,05$) (Figura 2A). Ao comparar pacientes e controles, observou-se maior produção de IL-6 nas hemoculturas dos pacientes, não estimuladas e nas estimuladas com MDP ($p < 0,05$; Figura 2A). Os valores individuais, para cada estímulo, são apresentados nas Figuras 2B-I.

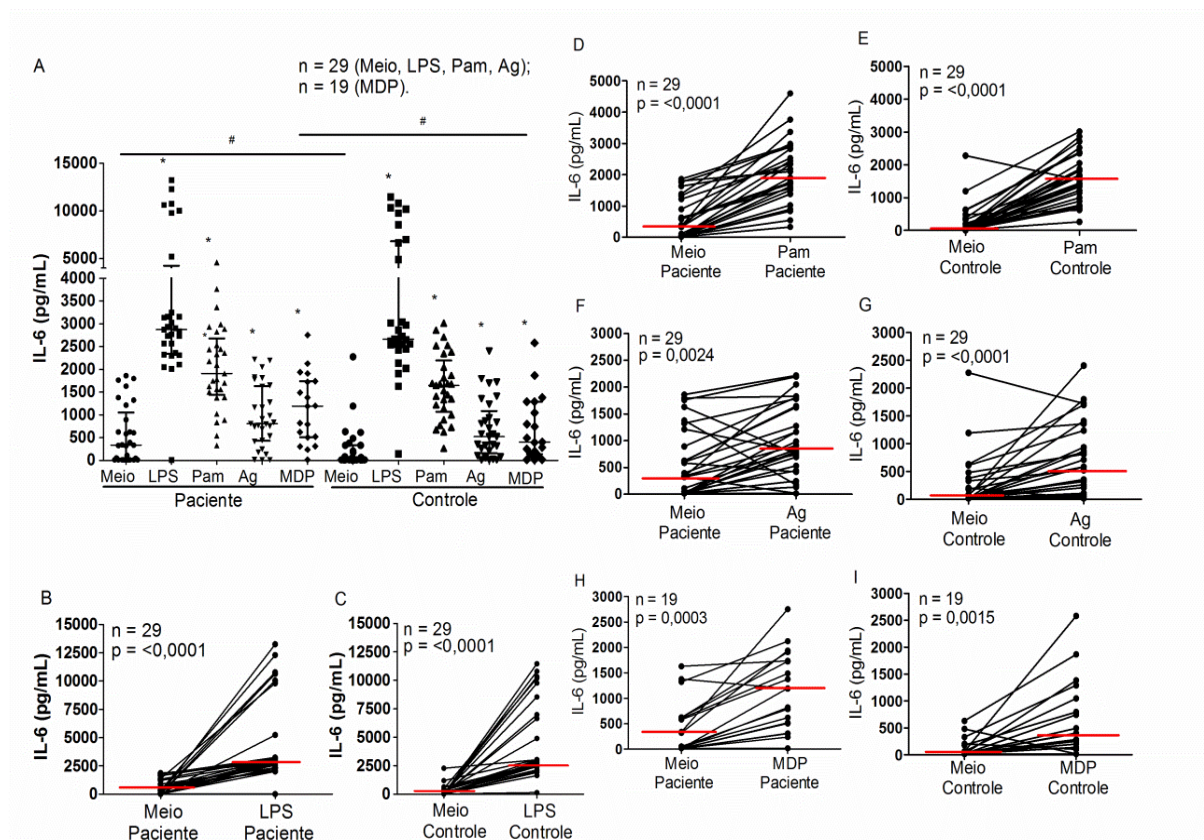


Figura 2. Avaliação da produção de interleucina 6 (IL-6) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada. Amostras de sangue periférico (diluído 1/3 em meio de cultura) de pacientes e controles foram incubadas com meio, lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *L. (V.) braziliensis* (Ag, 50 µg/mL), muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), por 6 horas, a 37 °C. Em seguida, a IL-6 foi mensurada nos sobrenadantes, por Elisa. Em A, cada símbolo representa um paciente ou controle, sendo as linhas horizontais as medianas e interquartis; n = número de amostras, *p < 0,05 (Meio vs estímulo), #p < 0,05 (pacientes vs controles). Testes de Wilcoxon (Meio vs estímulo) e Mann Whitney (pacientes vs controles). Em B, C, D, E, F, G, H e I são mostrados os resultados individualmente, após cada estímulo. As linhas horizontais são as medianas; n = número de amostras, p (Meio vs estímulo), Teste de Wilcoxon.

A produção de TNF α foi significativamente elevada nas hemoculturas dos pacientes e controles ativadas com LPS, Pam, Ag ou MDP (Figura 3A). Ao comparar pacientes e controles, em relação aos diferentes estímulos, não foram detectadas diferenças significantes quanto à produção desta citocina (Figura 3A). As Figuras 3B-I apresentam os resultados individuais, para cada estímulo.

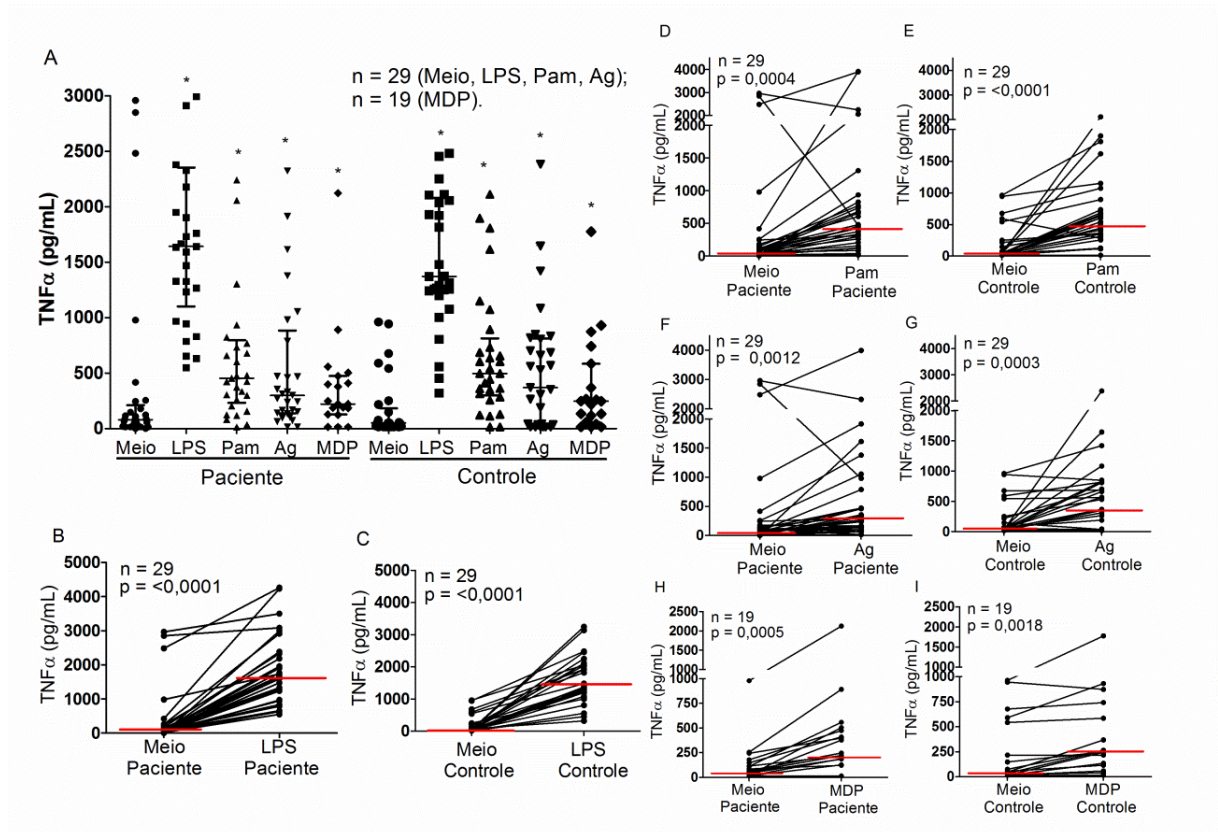


Figura 3. Avaliação da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada. Amostras de sangue periférico (diluído 1/3 em meio de cultura) de pacientes e controles foram incubadas com meio, lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *L. (V.) braziliensis* (Ag, 50 μ g/mL), muramildipeptídeo (MDP, 5 μ g/mL), por 6 horas. Em seguida, o TNF α foi mensurado nos sobrenadantes, por Elisa. Em A, cada símbolo representa um paciente ou controle, sendo as linhas horizontais, as medianas e interquartis; n = número de amostras, *p < 0,05 (Meio vs estímulo); Testes Wilcoxon (Meio vs estímulo) e Mann Whitney (pacientes vs controles). Em B-I, valores individuais e as medianas são apresentados; n = número de amostras, p (Meio vs estímulo), Teste de Wilcoxon.

Na avaliação da produção de IL-10, houve indução significativa desta citocina nas hemoculturas de pacientes e controles ativadas com LPS, Pam, Ag ou MDP (Figura 4A). Ao comparar pacientes e controles, em relação aos diferentes estímulos, não foram detectadas diferenças significantes quanto à produção de IL-10 (Figura 4A). As Figuras 4B-I mostram os resultados individuais para cada estímulo.

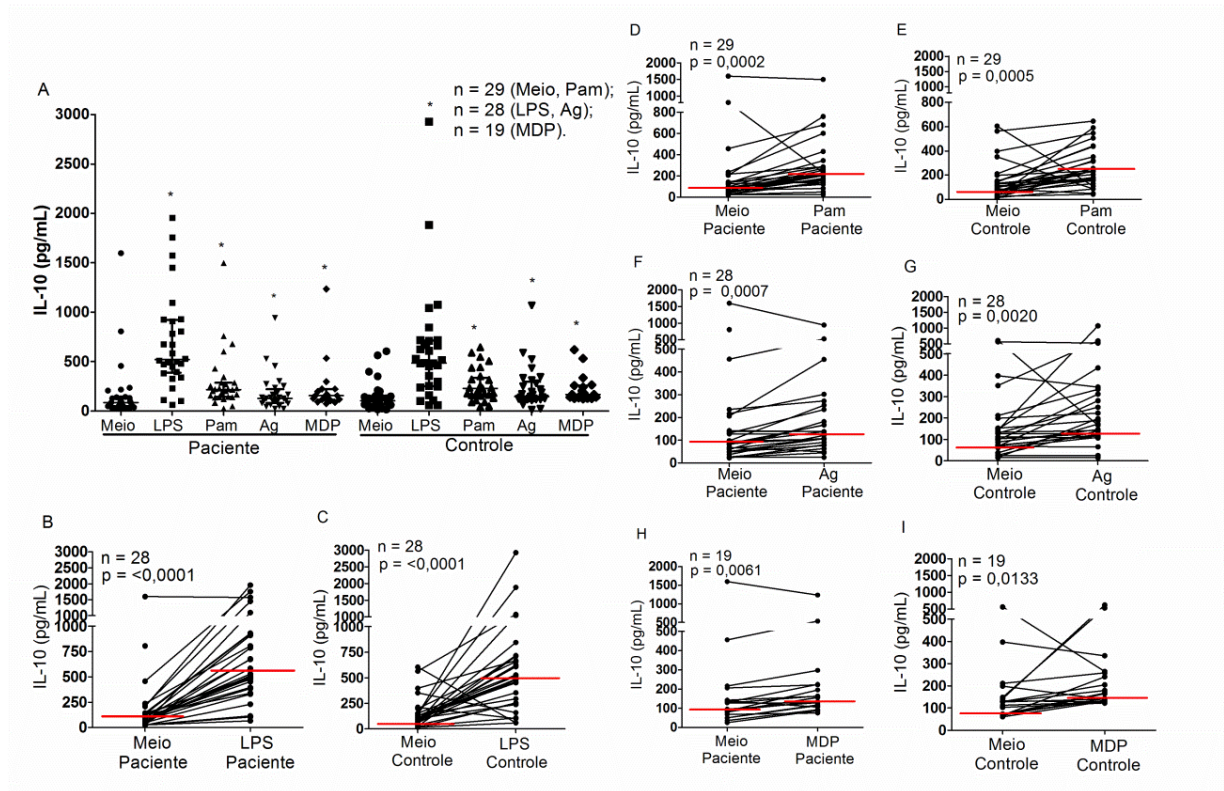


Figura 4. Avaliação da produção de interleucina 10 (IL-10) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada. Amostras de sangue periférico (diluído 1/3 em meio de cultura) de pacientes e controles foram incubadas com meio, lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *L. (V.) braziliensis* (Ag, 50 µg/mL), muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), por 24 horas. Em seguida, a IL-10 foi mensurada nos sobrenadantes, por Elisa. Em A, cada símbolo representa um paciente ou controle, sendo as linhas horizontais as medianas e interquartis; n = número de amostras, *p < 0,05 (Meio vs estímulo), Testes Wilcoxon (Meio vs estímulo) e Mann Whitney (pacientes vs controles). Em B-I, valores individuais e as medianas são apresentados; n = número de amostras, p (Meio vs estímulo), Teste de Wilcoxon.

5.3 Avaliação da interação entre os agonistas de TLR2 e de NOD2 para a indução de citocinas em hemoculturas de pacientes com leishmaniose cutânea localizada

Sabendo que Pam/TLR2 e MDP/NOD2 podem sinergizar para ativar células (Uehara et al. 2005), os estímulos Pam e MDP foram adicionados, separadamente ou conjuntamente, para ativar as hemoculturas; assim como, Ag e MDP. Pode ser observado nas Figuras 5 e 6, que a combinação Pam/MDP aumentou, significativamente, a produção de IL-6 nas hemoculturas dos pacientes e controles, em relação a cada estímulo sozinho (Figura 5A); de maneira similar, Ag e MDP juntos aumentaram a concentração desta citocina, especialmente em relação ao

estímulo Ag sozinho (Figura 5B). A Figura 6 (A-H) mostra os resultados individuais para cada estímulo isolado ou em combinação.

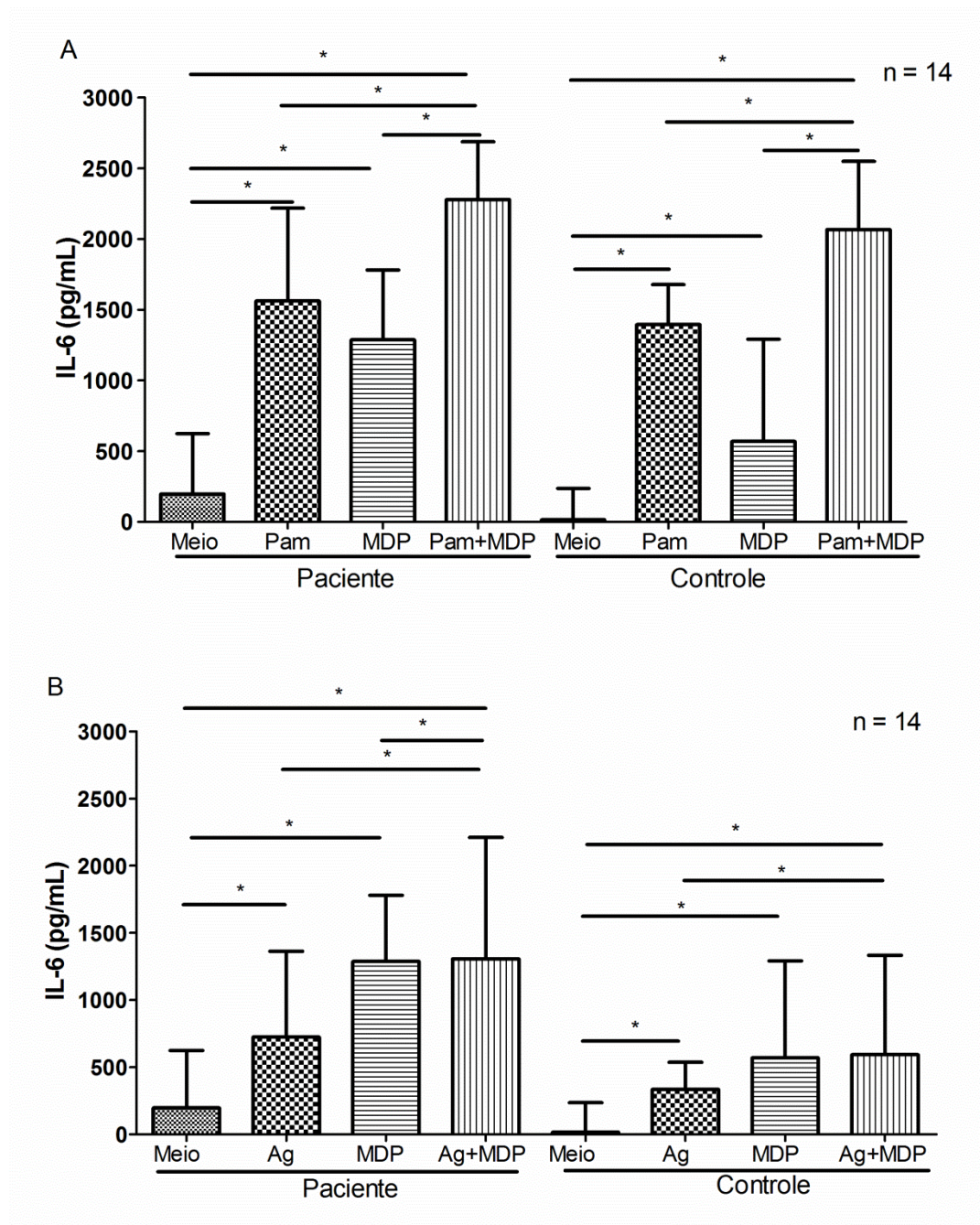


Figura 5. Avaliação da produção de interleucina 6 (IL-6) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada, após estímulos com agonistas de TLR2, NOD2 e antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis*. Amostras de sangue periférico (diluído 1/3 em meio de cultura) de pacientes e controles foram incubadas com meio, Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno (Ag, 50 µg/mL), muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), sozinhos ou em combinação, durante 6 horas. Os sobrenadantes foram usados para a dosagem de IL-6, por Elisa. Os dados representam as medianas e interquartis, *p < 0,05 (n = 14), teste pareado de Wilcoxon.

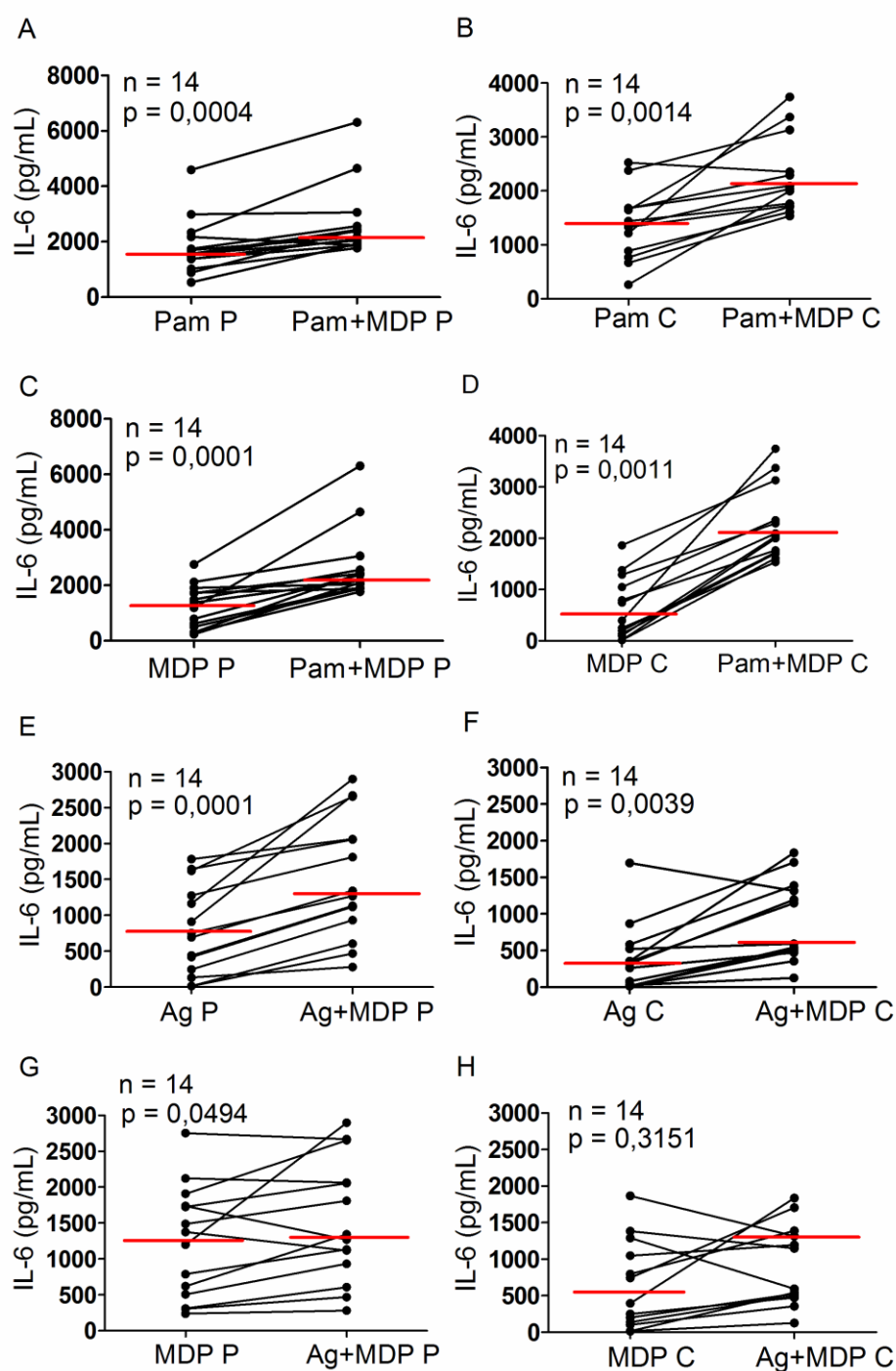


Figura 6. Efeito aditivo entre agonistas de TLR2/NOD2 e de antígeno de *Leishmania V. braziliensis* na produção de interleucina 6 (IL-6) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada. Amostras de sangue periférico (diluído 1/3 em meio de cultura) de pacientes (P) e controles (C) foram incubadas com meio, Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno (Ag, 50 µg/mL), muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), sozinhos ou em combinação, durante 6 horas. Os sobrenadantes foram usados para a dosagem de IL-6, por Elisa. Os dados representam os valores individuais e as linhas horizontais vermelhas são as medianas; n indica o número de pacientes ou controles, seguido pelo valor de p, Teste pareado de Wilcoxon.

Nas hemoculturas de pacientes e controles, a combinação dos estímulos Pam e MDP ou Ag e MDP aumentou, significativamente, a produção de $\text{TNF}\alpha$ em relação a cada estímulo sozinho (Figuras 7 e 8).

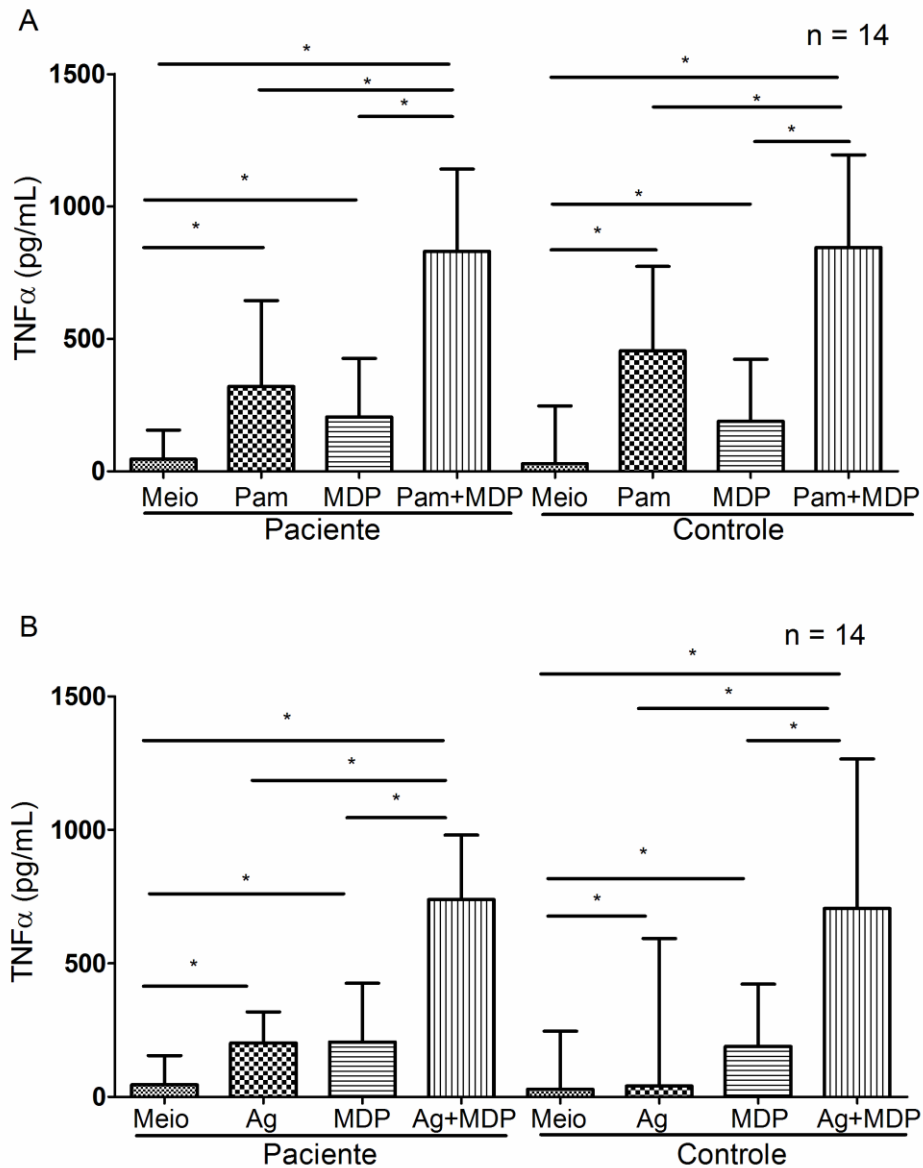


Figura 7. Avaliação da produção de $\text{TNF}\alpha$ em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada, após estímulos com agonistas de TLR2, NOD2 e antígeno de *Leishmania V. braziliensis*. Amostras de sangue periférico (diluído 1/3 em meio de cultura) de pacientes e controles foram incubadas com meio, Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno (Ag, 50 µg/mL), muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), sozinhos ou em combinação, durante 6 horas. Os sobrenadantes foram usados para a dosagem de $\text{TNF}\alpha$, por Elisa. Os dados representam as medianas e interquartis, *p < 0,05 (n = 14), Teste pareado de Wilcoxon.

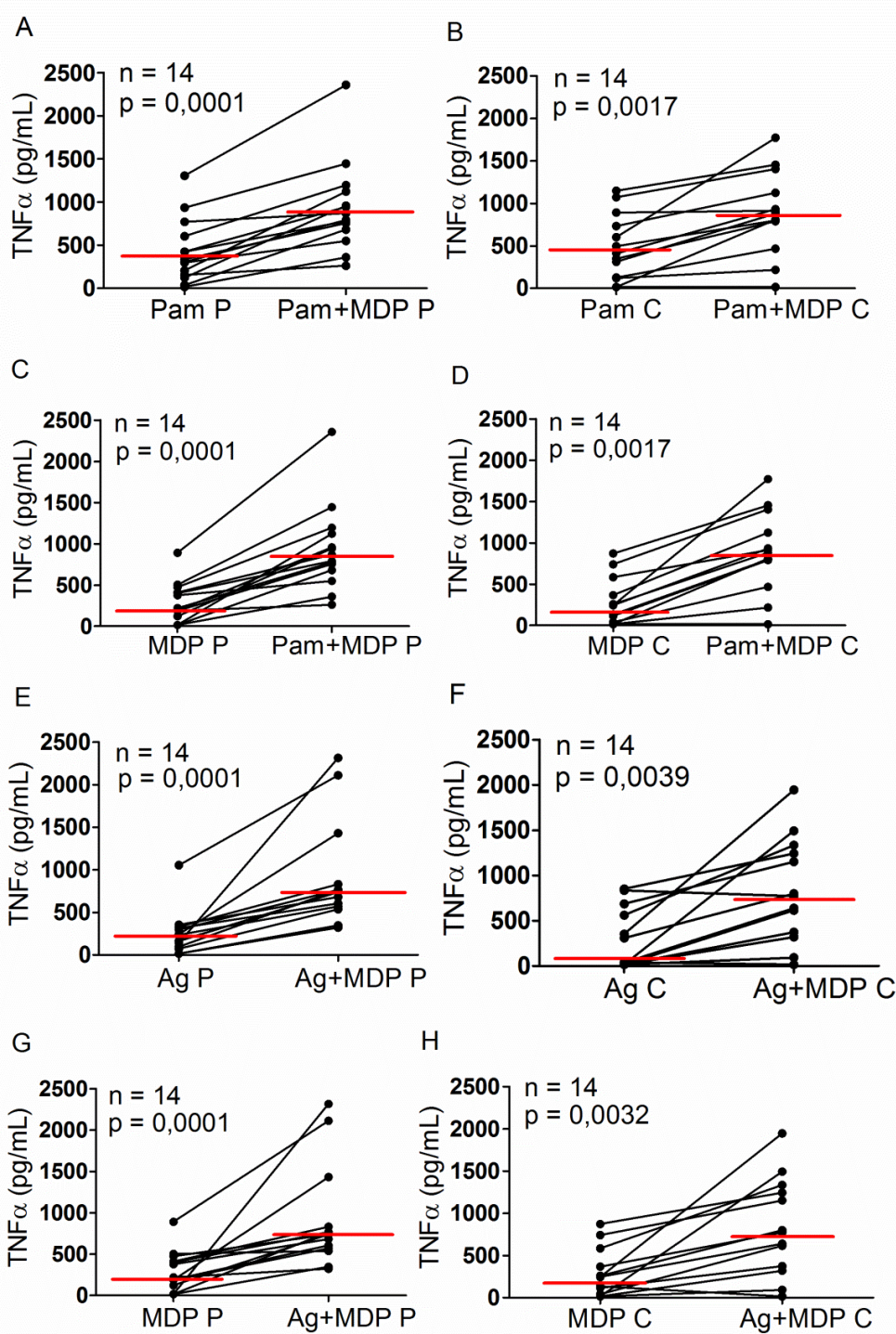


Figura 8. Efeitos aditivos entre agonistas de TLR2, NOD2 e antígeno de *Leishmania* (*V. braziliensis*) na produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada. Amostras de sangue periférico (diluído 1/3 em meio de cultura) de pacientes (P) e controles (C) foram incubadas com meio, Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), Antígeno (Ag, 50 μ g/mL), muramildipeptídeo (MDP, 5 μ g/mL), sozinhos ou em combinação, durante 6 horas. Os sobrenadantes foram usados para a dosagem de TNF α , por Elisa. n indica o número de pacientes ou controles, seguido pelo valor de p, Teste pareado de Wilcoxon.

A combinação dos estímulos Pam e MDP, nas hemoculturas de pacientes e controles, induziu maior produção de IL-10 quando comparada à cada estímulo sozinho. O Ag e o MDP juntos levaram a uma maior produção de IL-10, especialmente nas hemoculturas dos pacientes (Figuras 9 e 10).

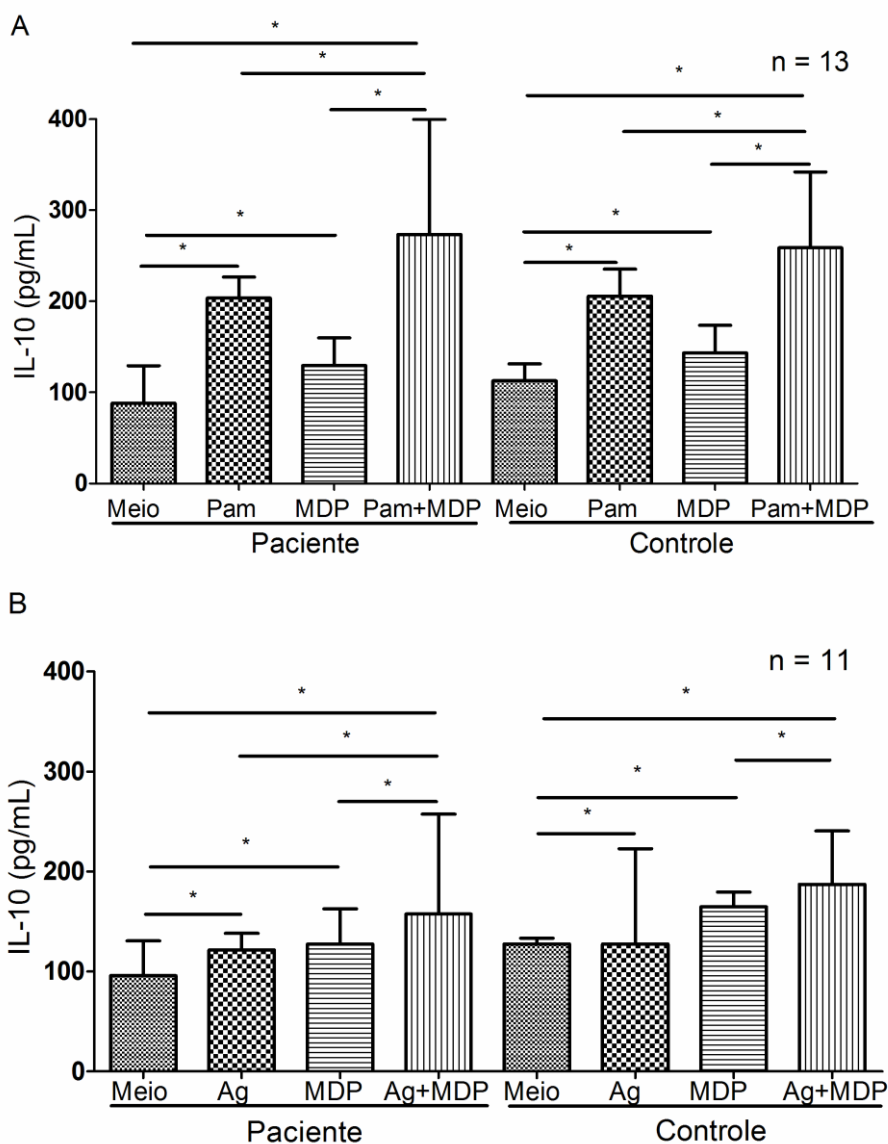


Figura 9. Avaliação da produção de interleucina 10 (IL-10) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada, após estímulos com agonistas de TLR2, NOD2 e antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis*. Amostras de sangue periférico (diluído 1/3 em meio de cultura) de pacientes e controles foram incubadas com meio, Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), Antígeno (Ag, 50 µg/mL), muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), sozinhos ou em combinação, durante 24 horas. Os sobrenadantes foram usados para a dosagem de IL-10, por Elisa. Os dados representam as medianas e interquartis, *p < 0,05 (n = 11), Teste pareado de Wilcoxon.

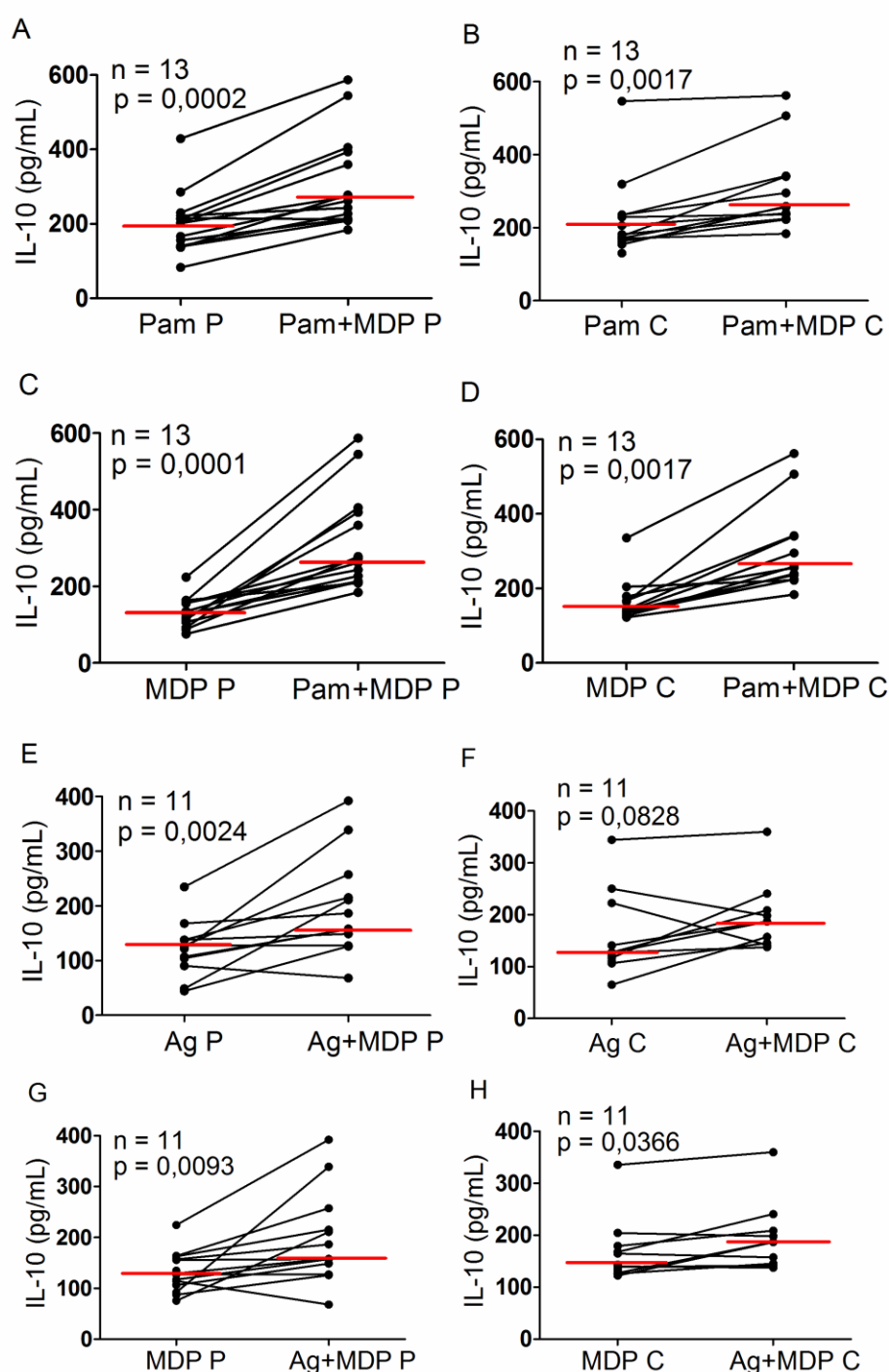


Figura 10. Avaliação dos efeitos aditivos entre agonistas de TLR2, NOD2 e antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* na produção de interleucina 10 (IL-10) em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada. Amostras de sangue periférico (diluído 1/3 em meio de cultura) de pacientes (P) e controles (C) foram incubadas com meio, Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), Antígeno (Ag, 50 µg/mL), muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), sozinhos ou em combinação, durante 24 horas. Os sobrenadantes foram usados para a dosagem de IL-10, por Elisa. n indica o número de pacientes ou controles, seguido pelo valor de p; Teste pareado de Wilcoxon.

5.4 Avaliação da associação entre os dados clínicos e a produção de citocinas em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada

Para avaliar se havia associação entre os dados clínicos dos pacientes com LCL observados ao diagnóstico e a concentração de citocinas pró- e anti-inflamatórias produzidas por eles naquele momento, foram analisados três dados importantes, o número de lesões, o tamanho da lesão e o tempo de lesão com a produção de IL-6, $\text{TNF}\alpha$ e IL-10 nas hemoculturas.

Não houve correlação significativa entre o número de lesões dos pacientes com LCL e as concentrações de IL-6, $\text{TNF}\alpha$ e IL-10 nas hemoculturas dos mesmos, independentemente de estimulação ou não das hemoculturas (Figuras 11, 12 e 13). Porém, é importante destacar que houve uma tendência a uma correlação positiva entre o número de lesões e as concentrações de IL-6 nas hemoculturas sem estímulo ($p = 0,09$) ou com o estímulo Pam₃Cys ($p = 0,08$; Figura 11).

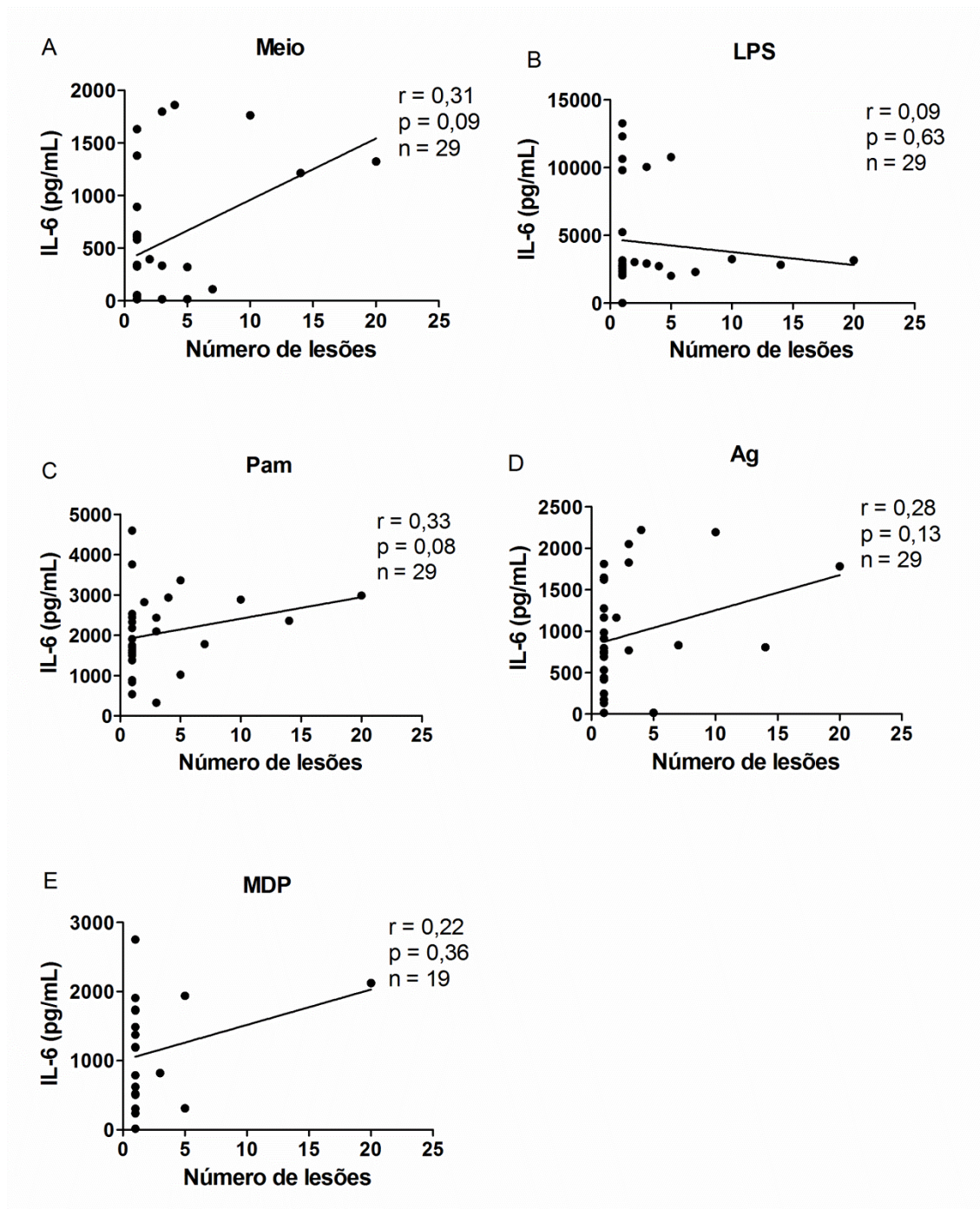


Figura 11. Avaliação da correlação entre o número de lesões e as concentrações de IL-6 nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada. As concentrações de IL-6 (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania* (*V.* *braziliensis* (Ag, 50 µg/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), usando Elisa. Os resultados (pg/mL) foram correlacionados com o número de lesões detectadas nos pacientes ao diagnóstico, usando teste de correlação de Spearman. Os dados representam os valores individuais e são apresentados r, p e n.

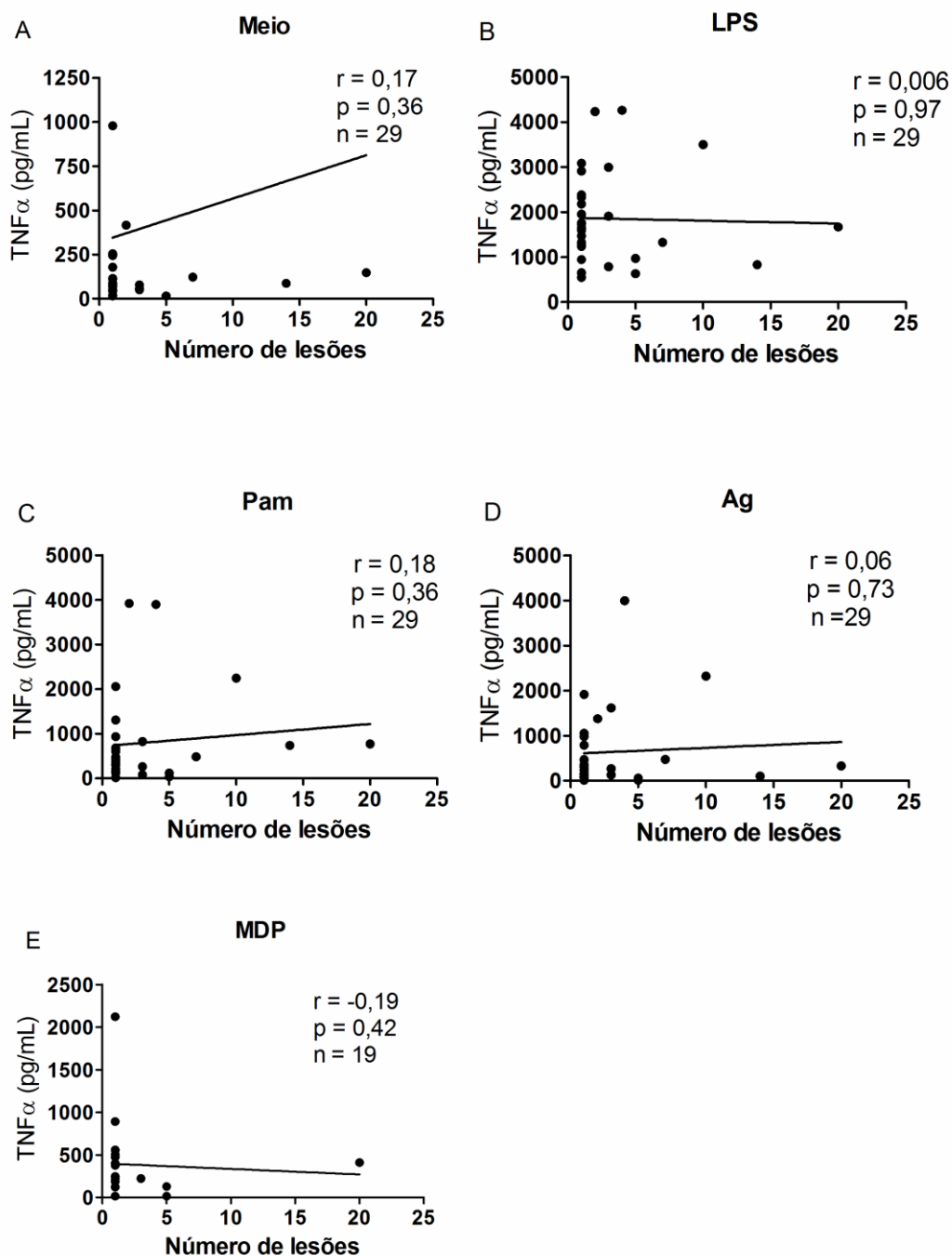


Figura 12. Avaliação da correlação entre o número de lesões e as concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada. As concentrações de TNF α (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag, 50 μ g/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 μ g/mL), usando Elisa. Os resultados (pg/mL) foram correlacionados com o número de lesões detectadas nos pacientes ao diagnóstico, usando o teste de correlação de Spearman. Os dados representam valores individuais e são apresentados r, n e p.

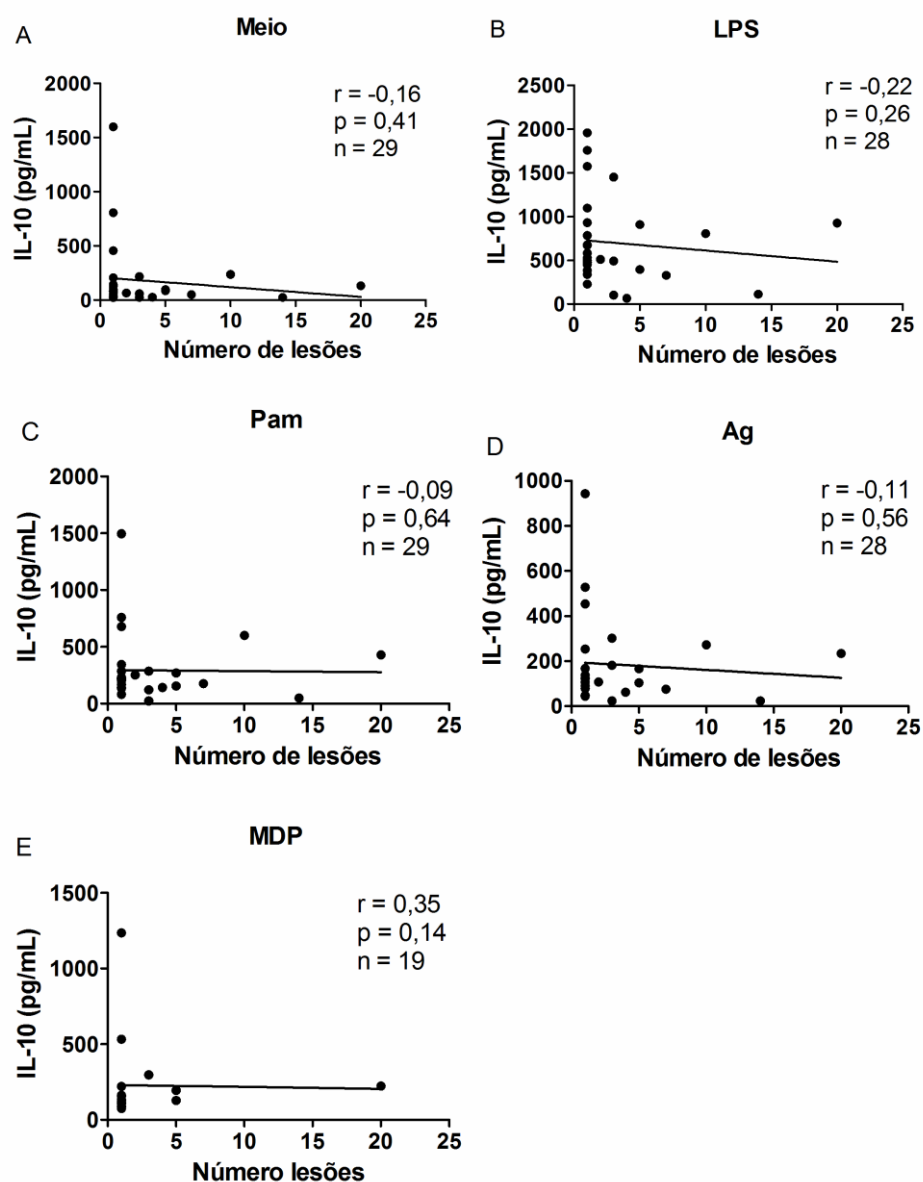


Figura 13. Avaliação da correlação entre o número de lesões e as concentrações de interleucina 10 (IL-10) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada. As concentrações de IL-10 (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag, 50 µg/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), usando Elisa. Os resultados (pg/mL) foram correlacionados com o número de lesões detectadas nos pacientes ao diagnóstico, utilizando o teste de correlação de Spearman. Os dados representam os valores individuais e são apresentados os valores de r , n e p .

Foi realizada, também, a comparação entre os resultados dos pacientes com apenas uma lesão e daqueles com mais de uma lesão quanto à produção de IL-6, TNF α e IL-10. Como pode ser observado nas Figuras 14, 15 e 16, não houve diferenças significantes entre os dois grupos em relação à concentração dessas citocinas.

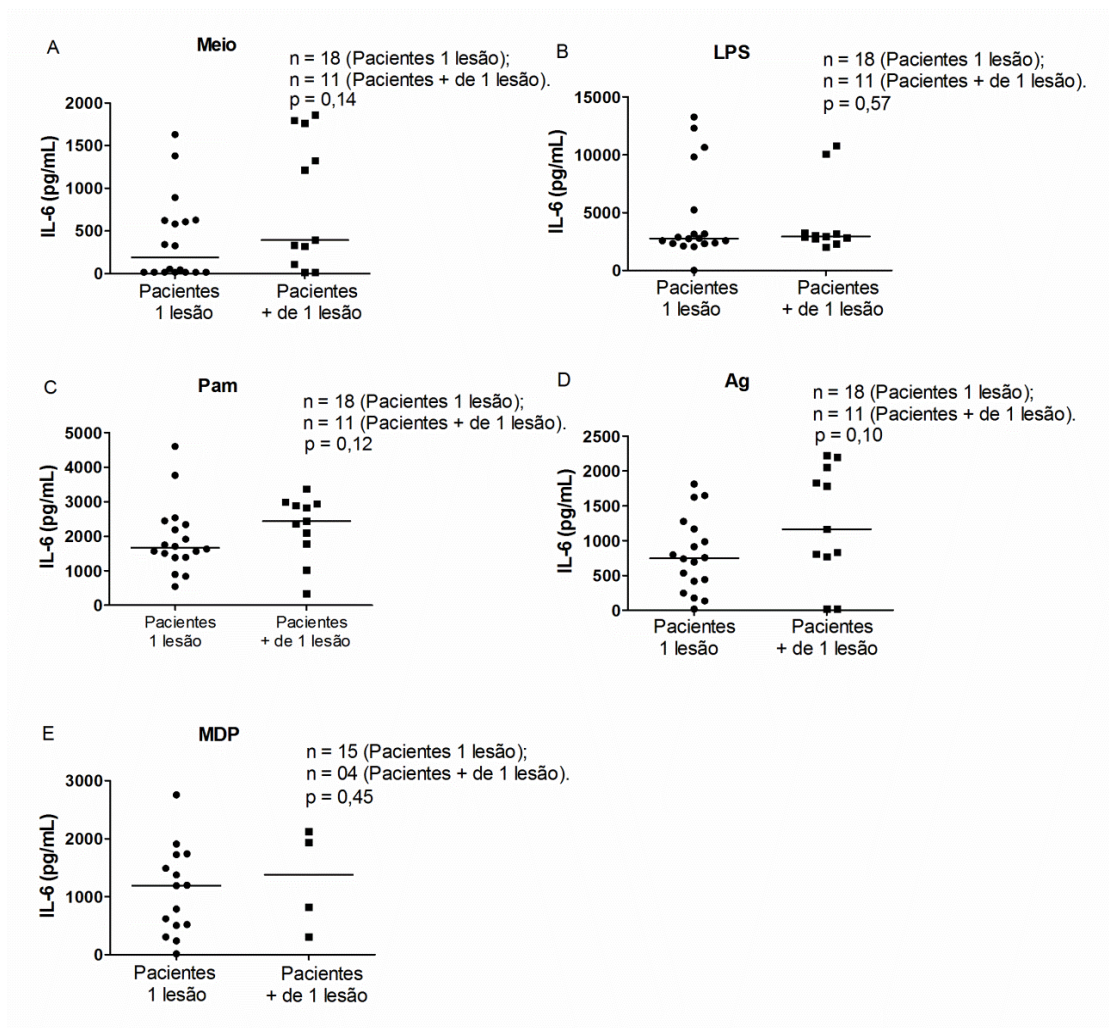


Figura 14. Avaliação da produção de interleucina 6 (IL-6) em pacientes com uma lesão e pacientes com mais de uma lesão. As concentrações de IL-6 (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas, de pacientes com apenas uma lesão e de pacientes com mais de uma lesão (variando de 2 a 20 lesões), na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania* (V.) *braziliensis* (Ag, 50 μ g/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 μ g/mL), usando Elisa. Os dados representam os valores individuais e as medianas, n = número de pacientes, seguido pelo valor de p. Teste de Mann Whitney.

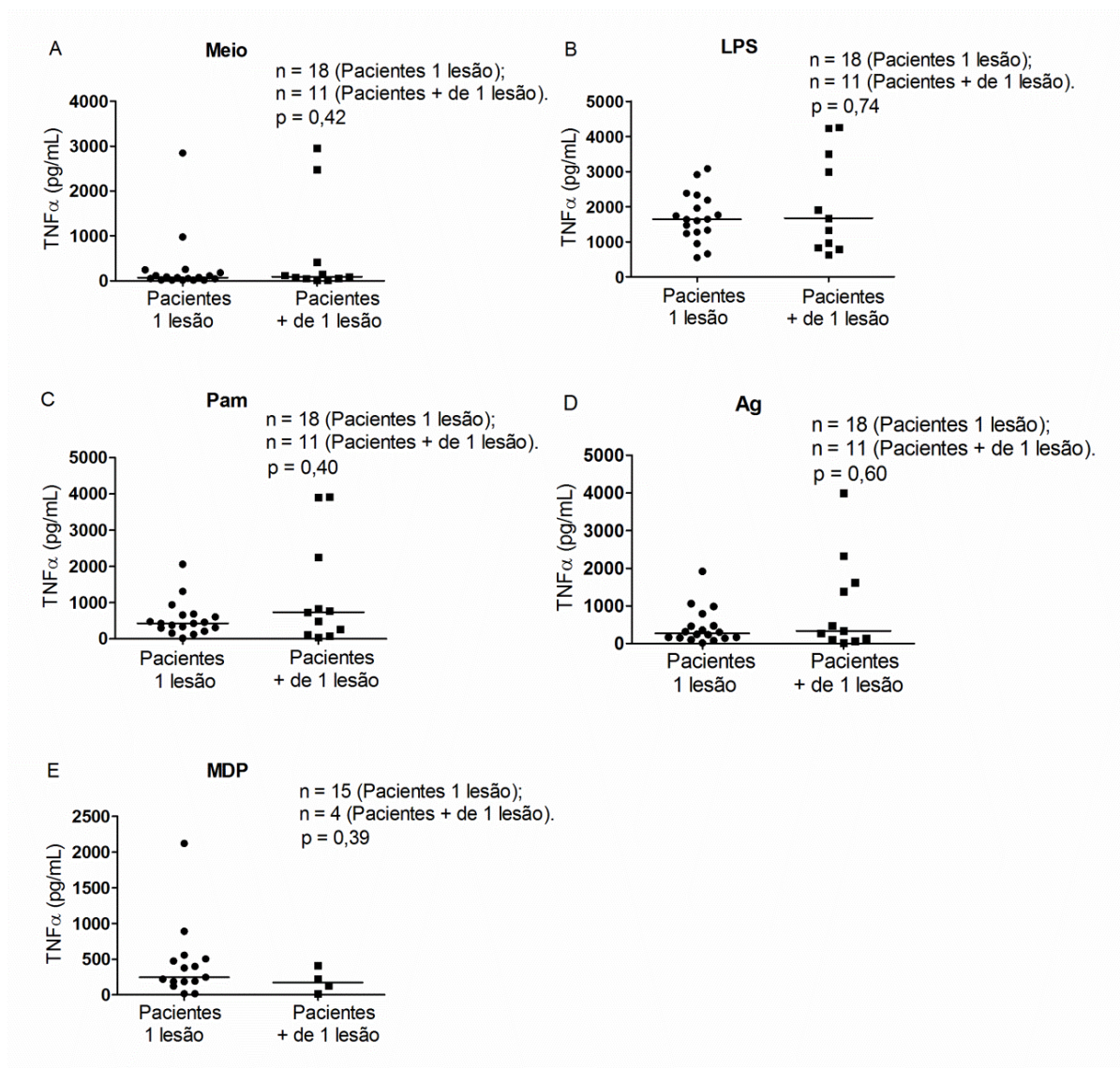


Figura 15. Avaliação da produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em pacientes com uma lesão e pacientes com mais de uma lesão. As concentrações de TNF α (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas, de pacientes com apenas uma lesão e de pacientes com mais de uma lesão (variando de 2 a 20 lesões), na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania* (*V.* *braziliensis* Ag, 50 μ g/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 μ g/mL), usando Elisa. Os dados representam os valores individuais e as medianas, n = número de pacientes, seguido pelo valor de p. Teste de Mann Whitney.

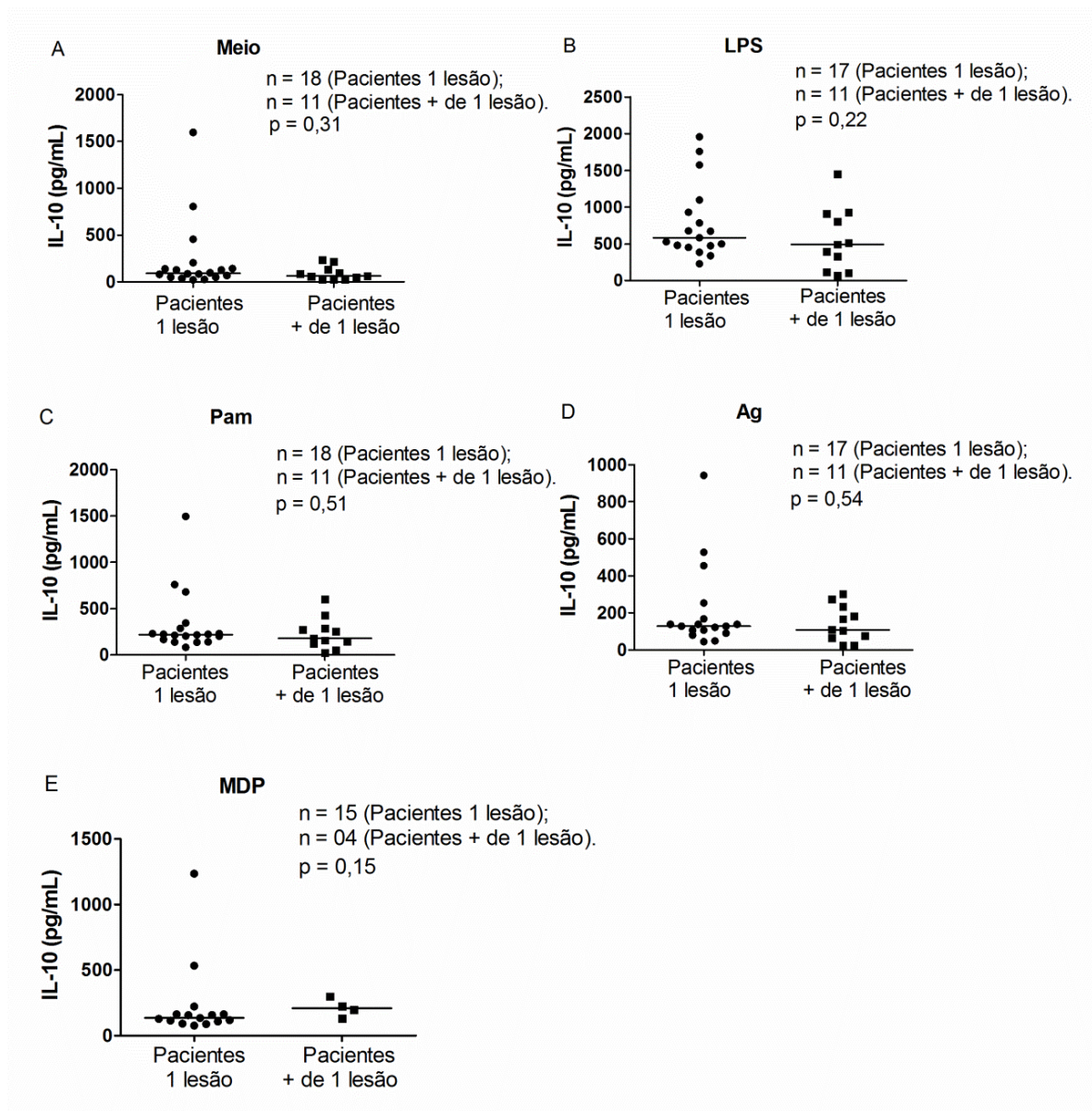


Figura 16. Avaliação da produção de interleucina 10 (IL-10) em pacientes com uma lesão e pacientes com mais de uma lesão. As concentrações de IL-10 (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas, de pacientes com apenas uma lesão e de pacientes com mais de uma lesão (variando de 2 a 20 lesões), na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania* (V.) *braziliensis* (Ag, 50 µg/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), usando Elisa. Os dados representam os valores individuais e as medianas, n = número de pacientes, seguido pelo valor de p. Teste de Mann Whitney.

Em relação ao tamanho das lesões, somente os pacientes com uma lesão foram selecionados para avaliar a correlação com a produção de citocinas. Não foi observada correlação entre o tamanho da lesão e as concentrações de IL-6, TNF α e IL-10 (Figuras 17, 18 e 19), porém, houve uma tendência a correlação negativa entre o tamanho da lesão e as concentrações de IL-10 nas hemoculturas estimuladas com Pam₃Cys ($p = 0,07$), Ag ($p = 0,06$) e MDP ($p = 0,05$; Figura 19).

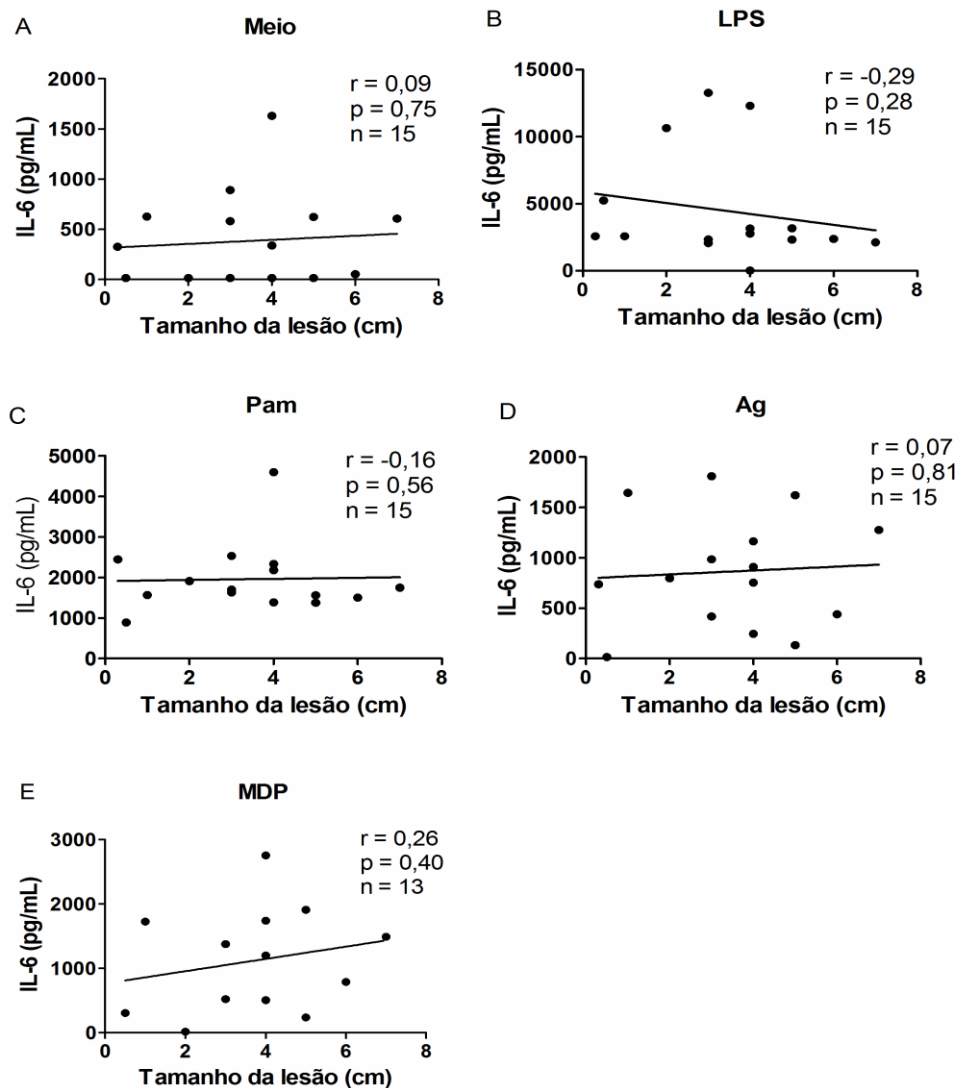


Figura 17. Avaliação da correlação entre o tamanho das lesões e as concentrações de interleucina 6 (IL-6) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada. As concentrações de IL-6 (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag, 50 μ g/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 ug/mL), usando Elisa. Os resultados (pg/mL) foram correlacionados com o tamanho das lesões (variando de 0,3 a 8 cm) detectadas nos pacientes que ao diagnóstico apresentaram apenas uma lesão, utilizando o teste de correlação de Spearman. Os dados representam os valores individuais e são apresentados os valores de r, n e p.

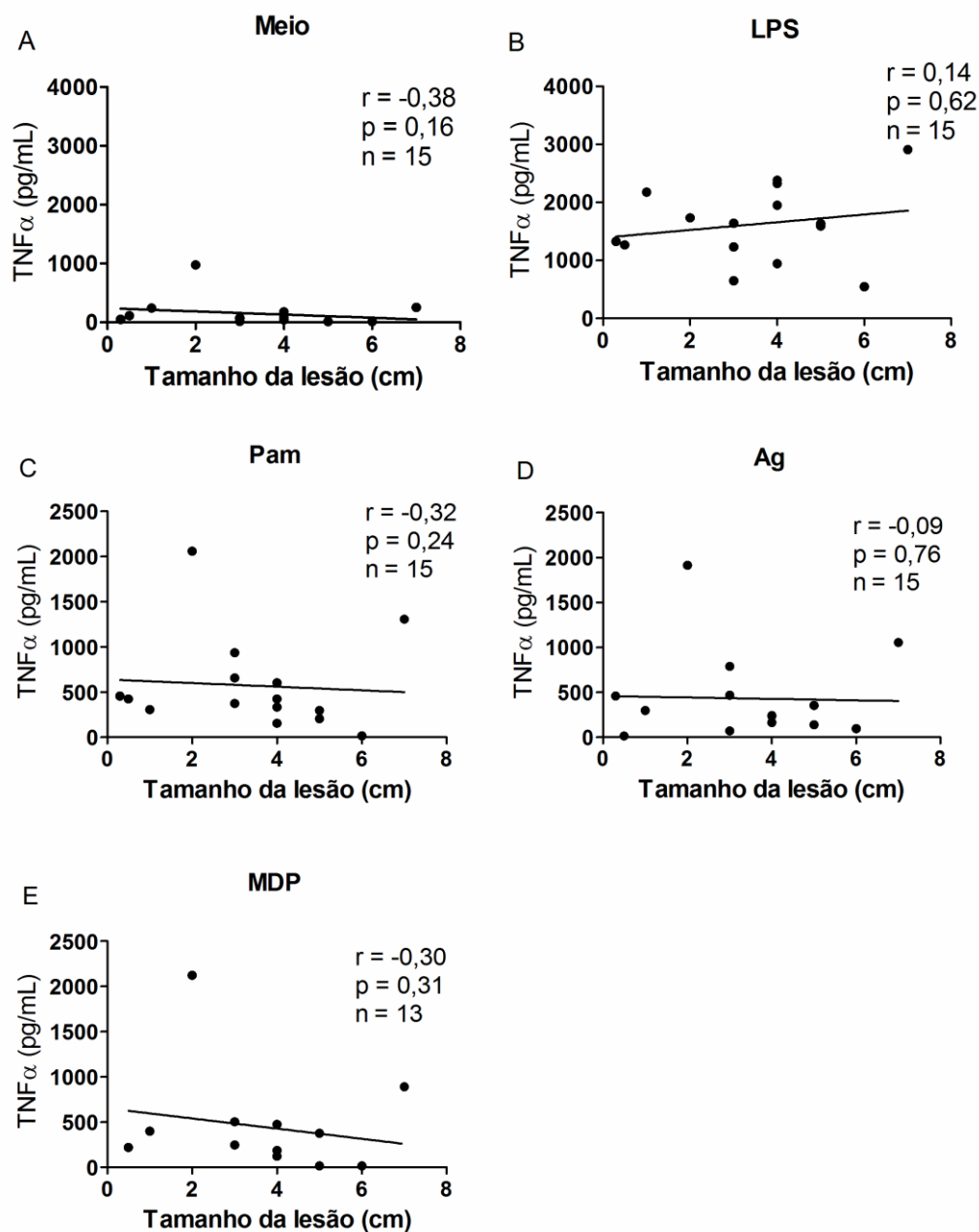


Figura 18. Avaliação da correlação entre o tamanho das lesões e as concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada. As concentrações de TNF α (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag, 50 μ g/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 μ g/mL), usando Elisa. Os resultados (pg/mL) foram correlacionados com o tamanho das lesões (variando de 0,3 a 8 cm) detectadas nos pacientes que ao diagnóstico apresentaram apenas uma lesão, utilizando o teste de correlação de Spearman. Os dados representam os valores individuais e são apresentados os valores de r, n e p.

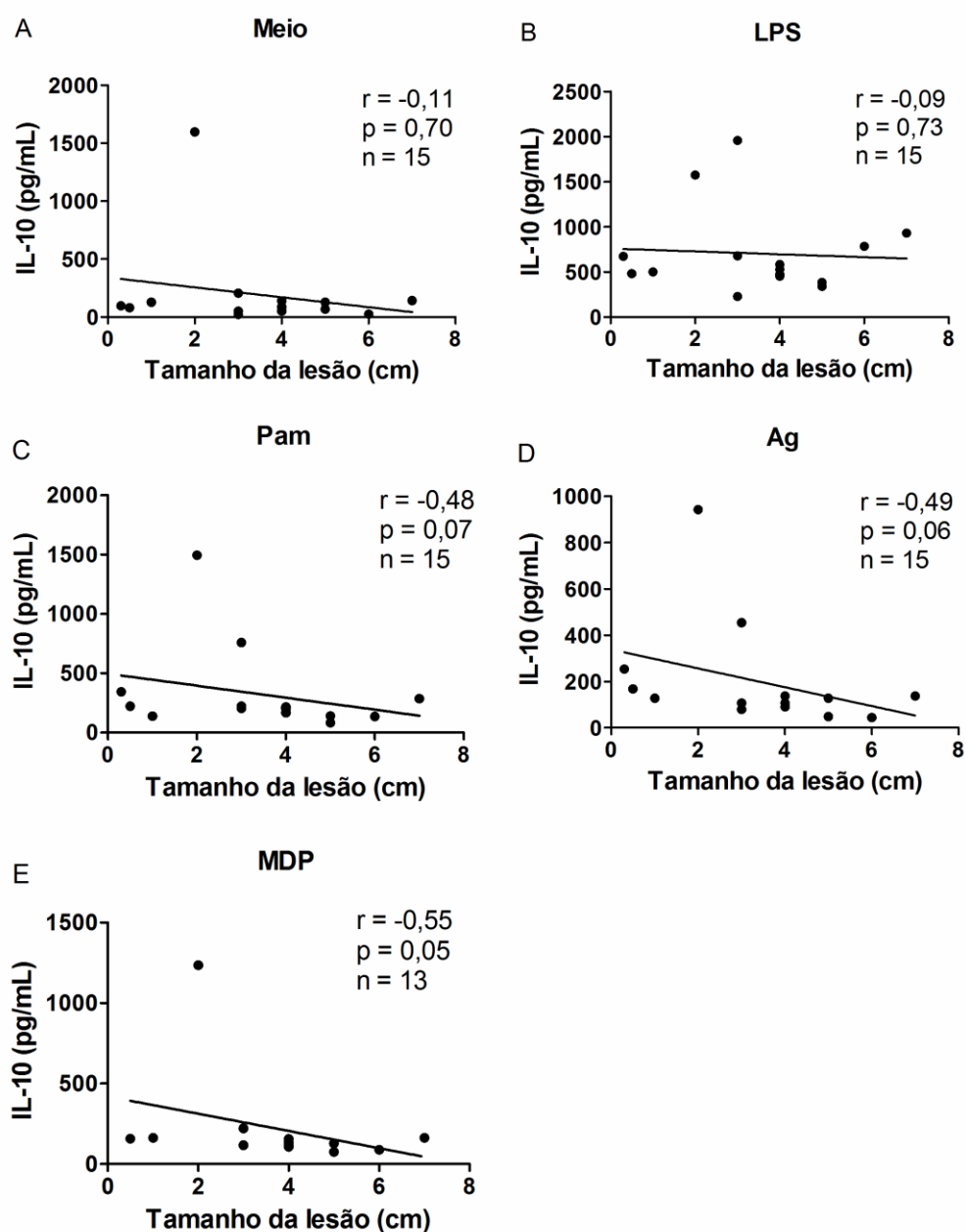


Figura 19. Avaliação da correlação entre o tamanho das lesões e as concentrações de interleucina 10 (IL-10) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada. As concentrações de IL-10 (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag, 50 µg/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), usando Elisa. Os resultados (pg/mL) foram correlacionados com o tamanho das lesões (variando de 0,3 a 8 cm) detectadas nos pacientes que ao diagnóstico apresentaram apenas uma lesão, utilizando o teste de correlação de Spearman. Os dados representam os valores individuais e são apresentados os valores de r , n e p .

Não foi detectada uma correlação entre o tempo de lesão ao diagnóstico e as concentrações de IL-6, $\text{TNF}\alpha$ e IL-10 (Figuras 20, 21 e 22), porém, houve uma tendência a correlação positiva entre o tempo de lesão e IL-10, nas hemoculturas sem estímulo ($p = 0,05$) e com o estímulo MDP ($p = 0,07$; Figura 22).

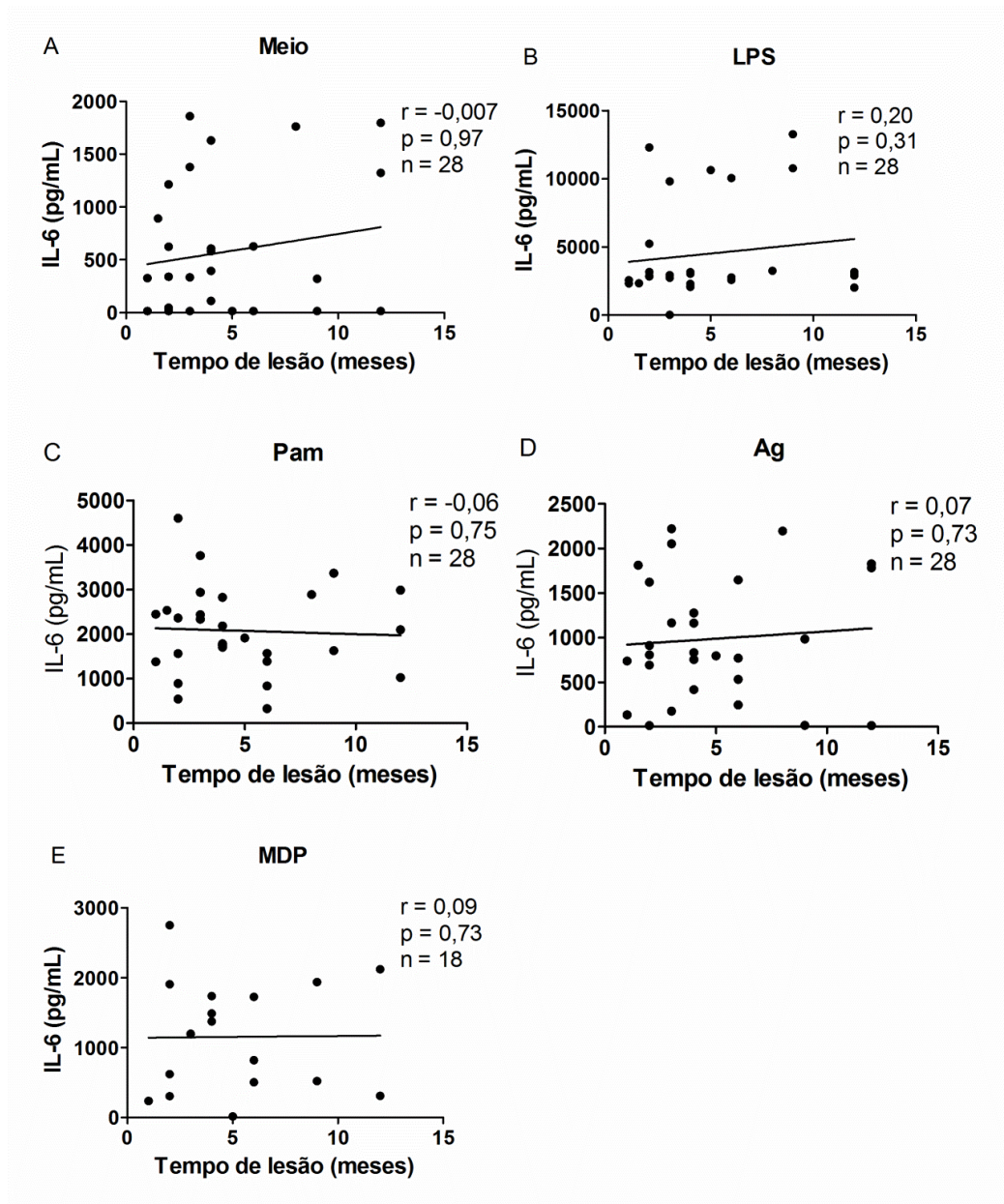


Figura 20. Avaliação da correlação entre o tempo de lesão e as concentrações de interleucina 6 (IL-6) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada. As concentrações de IL-6 (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag, 50 $\mu\text{g/mL}$) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 $\mu\text{g/mL}$), usando Elisa. Os resultados (pg/mL) foram correlacionados com o tempo de lesão informado pelos pacientes ao diagnóstico, utilizando o teste de correlação de Spearman. Os dados representam os valores individuais e são apresentados os valores de r , n e p .

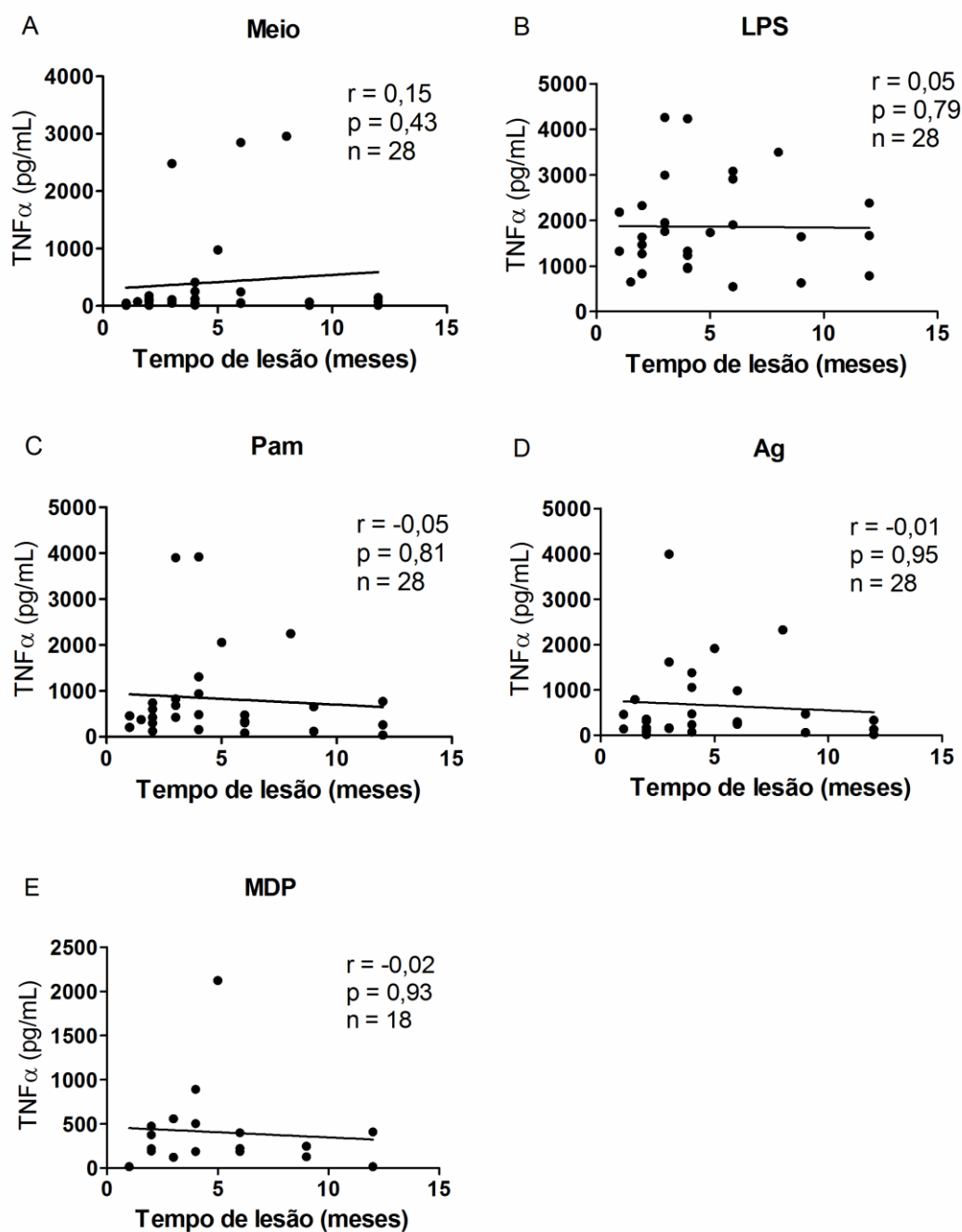


Figura 21. Avaliação da correlação entre o tempo de lesão e as concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada. As concentrações de TNF α (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag, 50 μ g/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 μ g/mL), usando Elisa. Os resultados (pg/mL) foram correlacionados com o tempo de lesão informado pelos pacientes ao diagnóstico, utilizando o teste de correlação de Spearman. Os dados representam os valores individuais e são apresentados os valores de r , n e p .

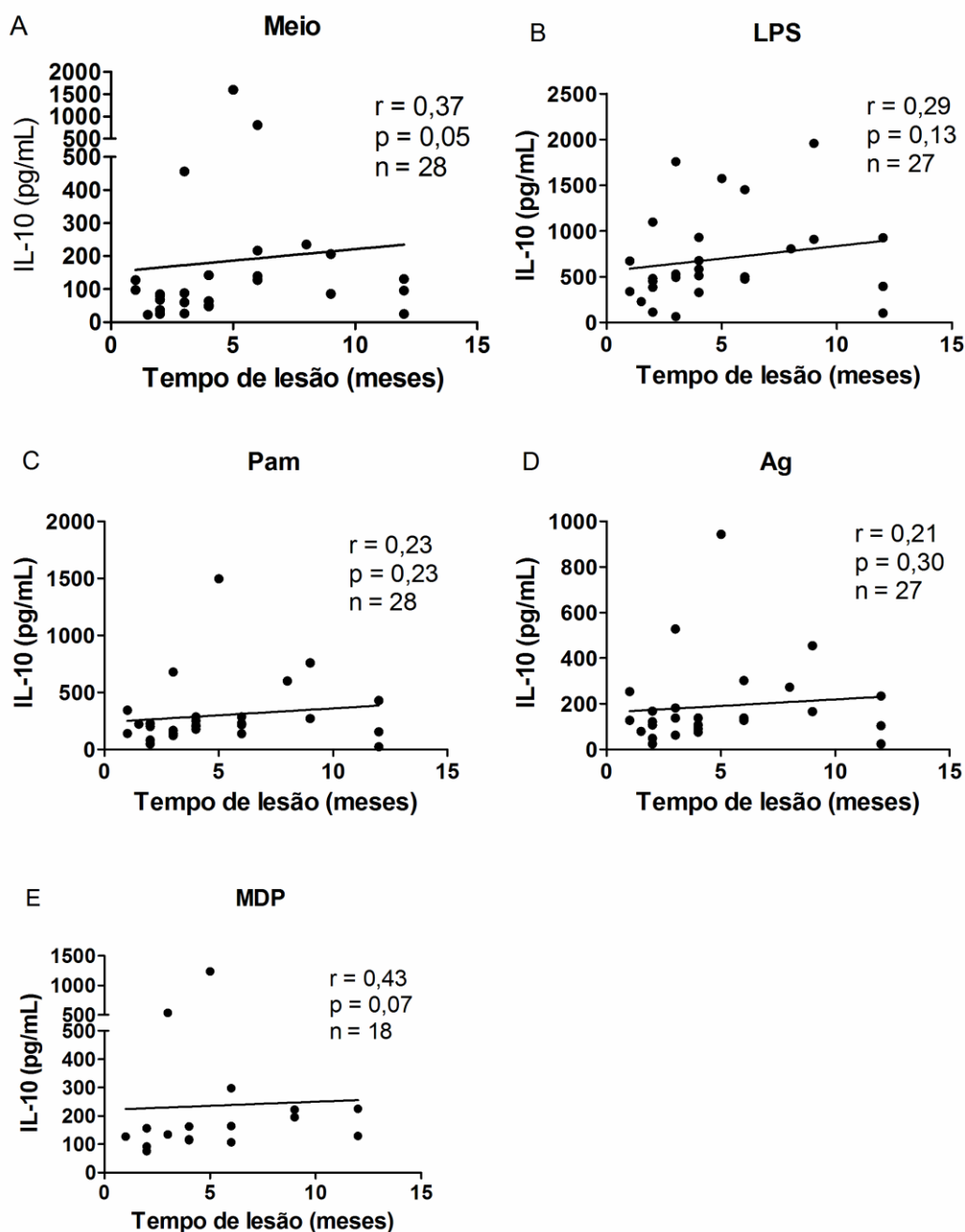


Figura 22. Avaliação da correlação entre o tempo de lesão e as concentrações de interleucina 10 (IL-10) nas hemoculturas de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada. As concentrações de IL-10 (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag, 50 µg/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), usando Elisa. Os resultados (pg/mL) foram correlacionados com o tempo de lesão informado pelos pacientes ao diagnóstico, utilizando o teste de correlação de Spearman. Os dados representam os valores individuais e são apresentados os valores de r, n e p.

5.5 Avaliação da associação da produção de citocinas em hemoculturas de pacientes com o desfecho clínico após terapia

Visando elucidar o papel das citocinas IL-6, TNF α e IL-10 na resposta terapêutica dos pacientes com LCL, as concentrações destas citocinas nas hemoculturas ao diagnóstico, foram comparadas entre os grupos de pacientes clinicamente curados após um ciclo de medicamento (glucantime, na maioria dos casos) e aqueles clinicamente curados após mais de um ciclo de medicamento (seis pacientes curados com dois ciclos de glucantime, um paciente curado com um ciclo de glucantime e um ciclo de fluconazol e outro paciente curado com dois ciclos de fluconazol e um ciclo de miltefosine).

Quando comparados os dois grupos de pacientes (um ciclo vs mais de um ciclo de tratamento) em relação à produção de IL-6, foi observado que esta foi mais elevada nos pacientes curados com mais de um ciclo de medicamento (MDP, $p < 0,05$; Figura 23). Em relação às concentrações de TNF α (Figura 24) e IL-10 (Figura 25) não foram atestadas diferenças significantes entre os grupos.

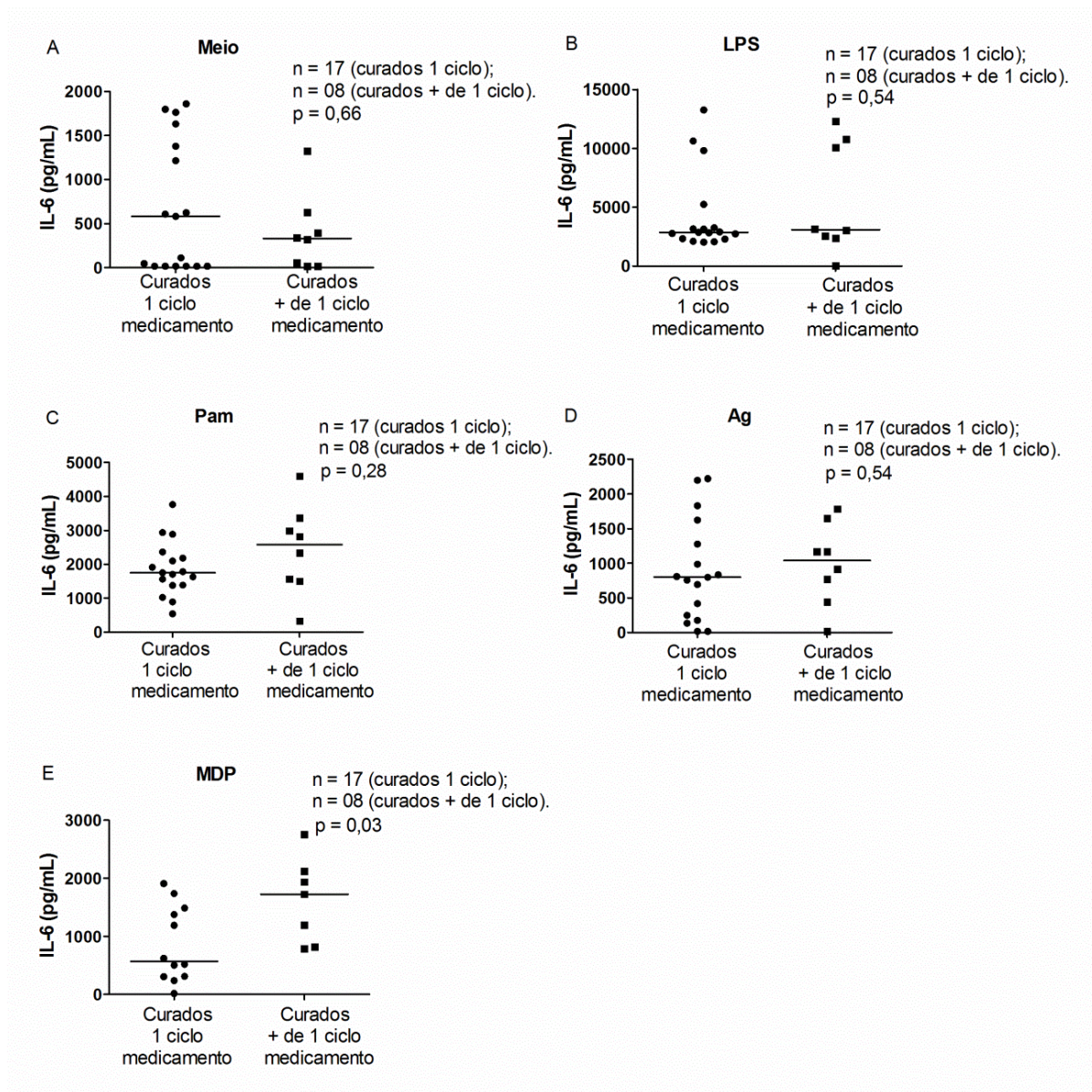


Figura 23. Avaliação da produção de interleucina 6 (IL-6) em pacientes clinicamente curados com um ciclo de tratamento e pacientes curados com mais de um ciclo de tratamento. As concentrações de IL-6 (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas, de pacientes clinicamente curados com um ciclo de medicamento ou pacientes clinicamente curados com mais de um ciclo de medicamento, na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* (Ag, 50 µg/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), usando Elisa. Os dados representam os valores individuais e as medianas, seguido pelo valor de p. Teste de Mann Whitney.

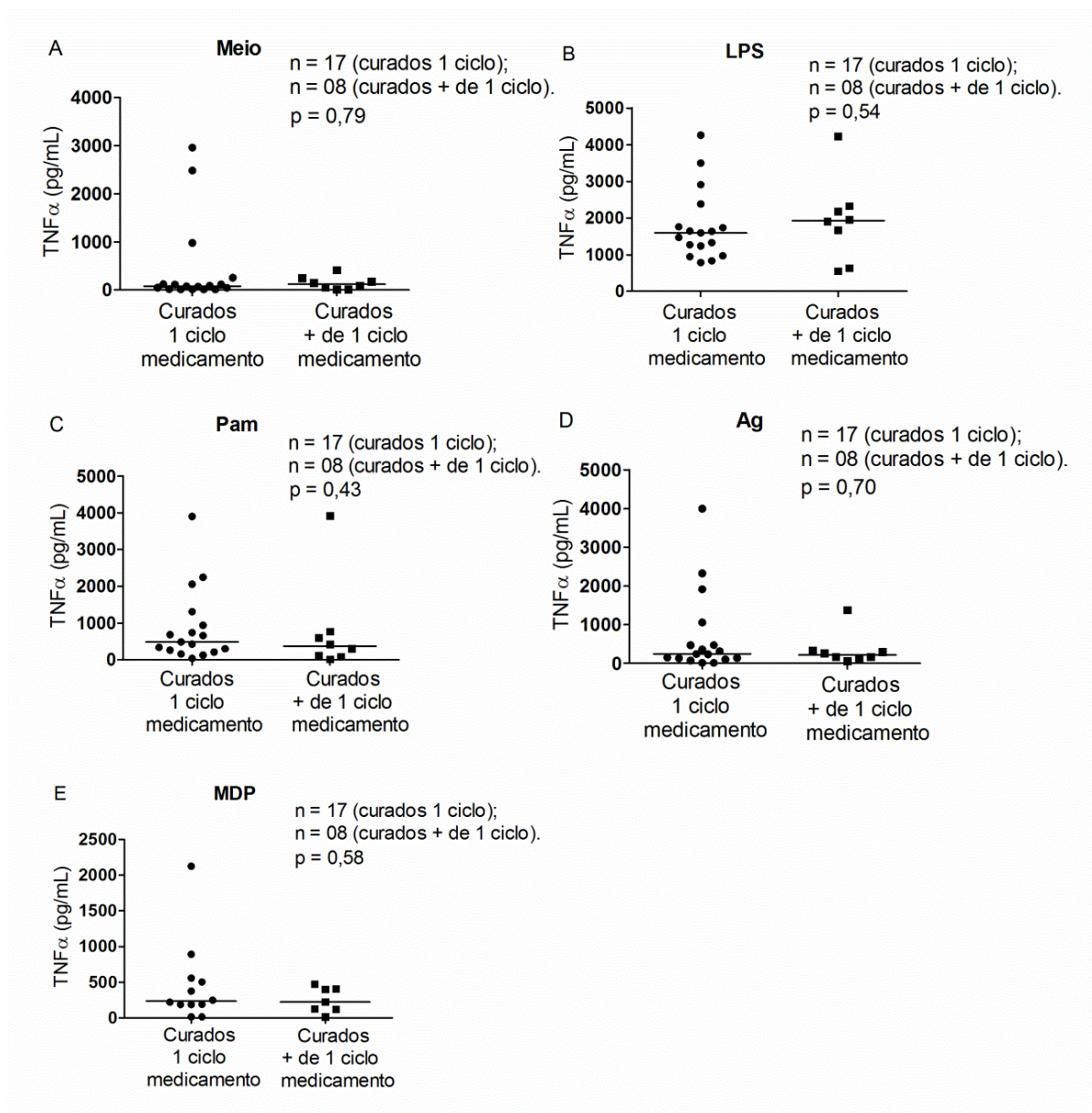


Figura 24. Avaliação da produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em pacientes clinicamente curados com um ciclo de tratamento e pacientes curados com mais de um ciclo de tratamento. As concentrações de TNF α (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas, de pacientes clinicamente curados com um ciclo de medicamento ou pacientes clinicamente curados com mais de um ciclo de medicamento, na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania* (*V. braziliensis* (Ag, 50 μ g/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 μ g/mL), usando Elisa. Os dados representam os valores individuais e as medianas, seguido pelo valor de p. Teste de Mann Whitney.

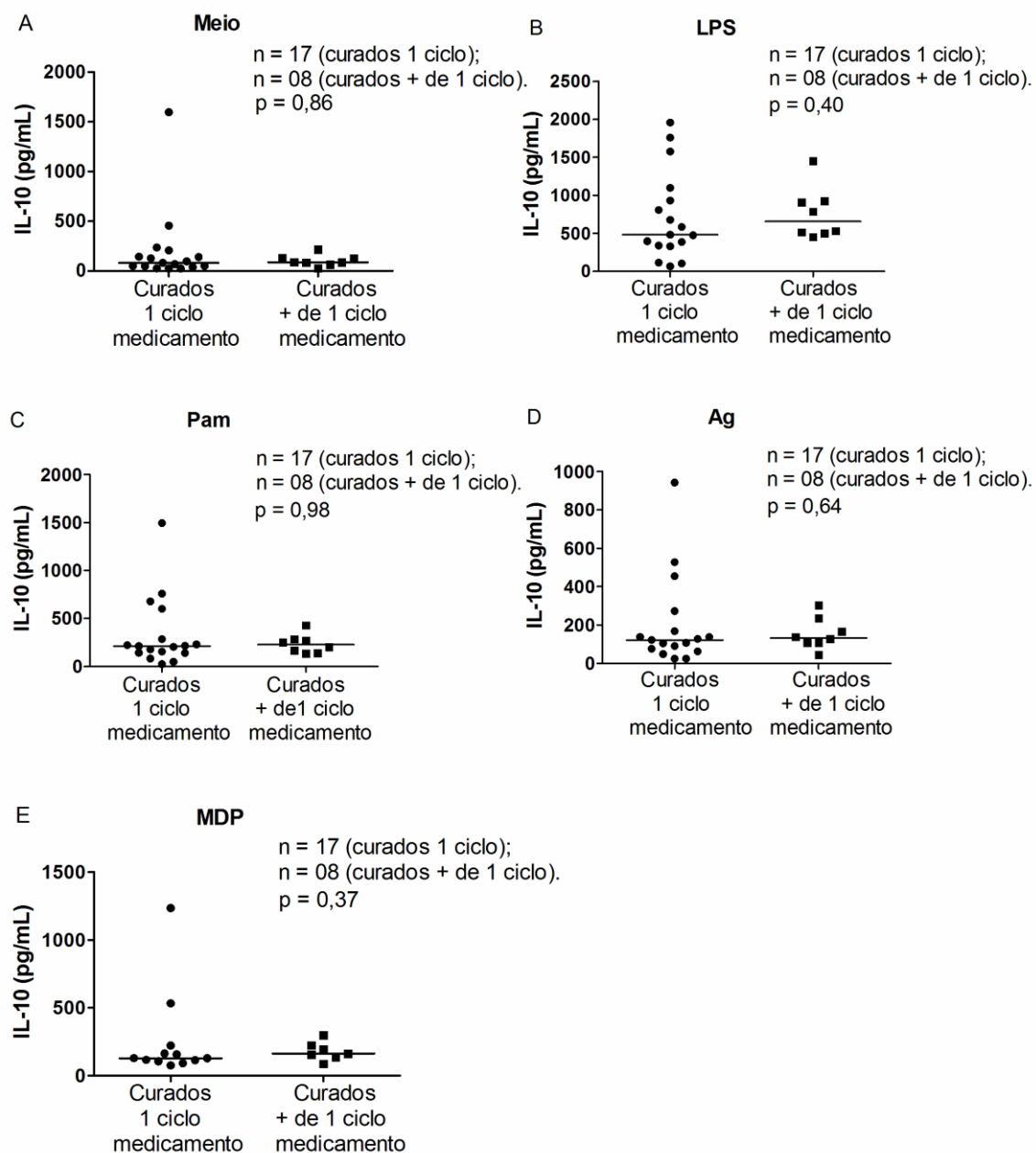


Figura 25. Avaliação da produção de interleucina 10 (IL-10) em pacientes clinicamente curados com um ciclo de tratamento e pacientes curados com mais de um ciclo de tratamento. As concentrações de IL-10 (A, B, C, D, E) foram determinadas nos sobrenadantes das hemoculturas, de pacientes clinicamente curados com um ciclo de medicamento ou pacientes clinicamente curados com mais de um ciclo de medicamento, na ausência de estímulo (meio) ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL), Pam₃Cys (Pam, 100 ng/mL), antígeno de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* (Ag, 50 µg/mL) ou muramildipeptídeo (MDP, 5 µg/mL), usando Elisa. Os dados representam os valores individuais e as medianas, seguido pelo valor de p. Teste de Mann Whitney.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram analisados 29 pacientes com LCL e como pode ser observado, houve prevalência da infecção no sexo masculino (75,9% dos casos), o que está de acordo com um estudo prévio Domingos et al. (2012) em que essa prevalência foi de 78,05%. Os hábitos de vida diários podem fazer com que os homens estejam mais expostos aos riscos de infecção em locais de habitat natural do inseto vetor, assim como em atividades laborais. Foi notada uma grande variação nas características clínicas dos pacientes (maioria dos pacientes com apenas uma lesão e os outros com duas até 20 lesões cutâneas, com diferentes tamanhos e duração das lesões até o diagnóstico variando de um a 12 meses), o que também é relatado em outros estudos (Carvalho 2004; Pereira 2012); indicando a necessidade de avaliação de um número maior de amostras antes que conclusões mais precisas possam ser definidas.

Em relação aos testes diagnósticos, 67,8% dos pacientes apresentaram exame histopatológico positivo. Em um extenso estudo de LTA no Brasil, analisaram-se biópsias de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* e foram encontrados os parasitos em 63,7% dos casos de forma cutânea (Magalhães et al. 1986; Gontijo & Carvalho 2003), semelhante ao resultado do presente trabalho. Neste estudo, 68% dos pacientes apresentaram o soro reagente na RIFI; o que está de acordo com a literatura. A sensibilidade dessa reação foi estimada em 71% na leishmaniose cutânea (Mendonça et al. 1988). Neste trabalho, 68,2% dos pacientes apresentaram IDRM positiva. Estima-se uma positividade deste teste em 84% nas formas cutâneas da leishmaniose (Shaw & Lainson 1975). Em um estudo retrospectivo, envolvendo pacientes com LTA de Montes Claros (MG), a IDRM foi positiva em 64,3% dos casos (Viana et al. 2012), corroborando com os achados do nosso estudo. No presente estudo, em 83,3% dos pacientes a técnica de PCR foi positiva para *Leishmania (Viannia) sp* nas amostras de fragmentos de biópsias das lesões. A sensibilidade dos métodos baseados em PCR é aumentada em 20 a 30% na LCL quando comparada ao diagnóstico parasitológico convencional (Reithinger et al. 2007).

A hemocultura foi escolhida, neste estudo, por ser uma técnica que permite a avaliação da ativação de células do sangue periférico em condições mais

fisiológicas. Os agonistas de TLR foram adicionados às hemoculturas para o estudo da produção das citocinas por monócitos, que são as principais células produtoras de $\text{TNF}\alpha$ e outras citocinas no sangue, após curtos períodos de incubação (Miles et al. 2002; Xing & Remink 2005; Damsgaard et al. 2009; Fokkema 2012; Schildberger et al. 2013). Isto se deve ao fato de que os monócitos são os leucócitos que mais expressam TLR4/CD14 e TLR2 (Sabroe et al. 2002). Os neutrófilos apresentam baixa expressão desses receptores, produzem pouquíssimo $\text{TNF}\alpha$ e não produzem IL-10, após estimulação com LPS (Sabroe et al. 2002; Smedman et al. 2009). Os eosinófilos, por sua vez, não possuem TLR2, TLR4 e CD14 e os basófilos têm baixa expressão de TLR2 e TLR4 e não expressam CD14; ambos os leucócitos não respondem ao LPS (Sabroe et al. 2002).

Neste estudo, foi demonstrado que nas hemoculturas dos pacientes e dos controles, houve produção significativa de IL-6, $\text{TNF}\alpha$ e IL-10, após estimulação com LPS, Pam, Ag ou MDP; mostrando que TLR4, TLR2 e NOD2 podem ser estimulados na infecção por leishmânia. Ao comparar pacientes e controles, em relação aos diferentes estímulos, não foram detectadas diferenças significantes quanto à produção de $\text{TNF}\alpha$ e IL-10. Em um estudo recente do nosso grupo (Veras 2015), os estímulos LPS, Pam e Ag induziram significativa produção de $\text{TNF}\alpha$ nas hemoculturas de pacientes e de controles (semelhante ao presente estudo) e somente o Ag não induziu quantidades significantes de IL-10 nas hemoculturas dos pacientes; o que difere deste estudo. As diferenças entre os resultados podem ser devido à heterogeneidade clínica dos pacientes com LCL ou a gravidade da doença, bem como, o uso de diferentes lotes de reagentes nas hemoculturas. Souza et al. (2012) mostraram que PBMCs de pacientes com LCL ativa e de indivíduos saudáveis produzem IL-10 em concentrações similares quando expostas a antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. Estudos que avaliaram a interação entre antígenos de leishmânia e PBMCs de pacientes com LTA revelaram que antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis* derivados de formas promastigotas são capazes de estimular a produção de uma variedade de citocinas, tais como, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-17 (Bacellar et al. 2002; Castellucci et al. 2006). Além disto, formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* estimularam a produção de IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF β , $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-17 e IL-23 em culturas de PBMCs de doadores saudáveis, sem história prévia de

leishmaniose (Gomes et al. 2014). Os resultados dos quatro últimos trabalhos citados corroboram com o presente estudo.

No presente estudo, quando comparados pacientes e controles quanto à produção de IL-6, observou-se maior produção desta citocina nas hemoculturas dos pacientes, não estimuladas e nas estimuladas com MDP. A ativação de NOD2 levou a uma maior produção de IL-6 nas hemoculturas dos pacientes em relação as hemoculturas dos controles. Foi demonstrado que linfócitos obtidos de pacientes com LM e LC produzem elevados níveis de IL-17 quando comparados com linfócitos obtidos de controles não infectados (Bacellar et al. 2009), o que de forma indireta, é semelhante ao encontrado no presente trabalho; já que, em seres humanos, a combinação da IL-1 β e da IL-6 foi demonstrada ser suficiente para a geração de células Th17 produzindo IL-17 (Acosta-Rodriguez et al. 2007), que por sua vez, induz vários mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF α (Korn et al. 2007).

Neste trabalho, a combinação Pam/MDP aumentou, significativamente, a produção de IL-6, TNF α e IL-10 nas hemoculturas dos pacientes e controles, em relação a cada estímulo sozinho; de maneira similar, Ag e MDP juntos aumentaram a concentração destas citocinas (IL-6 e IL-10, especialmente nas hemoculturas dos pacientes). Logo, TLR2 e NOD2 foram ativados ao mesmo tempo e a produção de citocinas decorrente disso foi maior. Há estudos prévios mostrando os efeitos sinérgicos de MDP com agonistas de TLR em células monocíticas humanas em cultura (Yang et al. 2001; Uehara et al. 2005). No entanto, não foram encontrados estudos com as combinações de agonistas de TLR e agonistas NOD2 na LTA. O uso dos estímulos para o acionamento de TLRs e NOD2 presente nos monócitos, poderá contribuir para o entendimento do estado de ativação dessas células e a participação delas na LTA via aumento da produção de citocinas.

Na tentativa de avaliar se o nível de ativação dos monócitos do sangue periférico nos pacientes com LCL estava associado às manifestações clínicas da doença, foram realizados testes de correlação. Não houve correlação significativa entre o número de lesões dos pacientes com LCL e as concentrações de IL-6, TNF α e IL-10 nas hemoculturas dos mesmos. Quando foram comparados pacientes com apenas uma lesão e pacientes com mais de uma lesão, em relação à produção destas citocinas, também não foi detectada diferença significativa entre os dois grupos. Em um estudo anterior do nosso grupo (Pereira et al. 2012) foi detectada

uma correlação positiva entre as concentrações de $\text{TNF}\alpha$, presentes no soro ou em hemoculturas após os estímulos LPS, Pam₃Cys e antígeno de *L. (V.) braziliensis* e o número de lesões dos pacientes com LCL. A gravidade das lesões e o tempo das lesões até o diagnóstico, podem ser responsáveis pela diferença entre os estudos. Estudos mostram que o $\text{TNF}\alpha$ ativa os macrófagos para produzir NO e matar o parasito, mas também pode promover a injúria tecidual (Carvalho et al. 2012; Soong et al. 2012). Desse modo, o $\text{TNF}\alpha$ atua no controle da infecção, ajudando na eliminação dos parasitos *Leishmania* sp, mas pode também exacerbar a lesão tecidual causada pela infecção. Níveis aumentados são importantes em um primeiro momento da doença, para o seu controle, mas, posteriormente, devem ser modulados para que ocorra a remissão ou a cura clínica das lesões.

No presente estudo foi detectada uma tendência a correlação positiva entre o número de lesões e as concentrações de IL-6 nas hemoculturas sem estímulo ou com o estímulo Pam₃Cys (a ativação via TLR2 foi uma das melhores para a indução de IL-6); sugerindo que há participação da IL-6 no dano tecidual em pacientes com LCL. A produção de IL-17, IL-1 β e IL-6 foi associada com lesão tecidual em pacientes com LM, mediada pela atração de neutrófilos e liberação de proteinases (Boaventura et al. 2010; Ghoreschi et al. 2010), mostrando uma relação entre IL-6 e lesão tecidual, o que corrobora com nosso achado. A produção de IL-17 por PBMCs é aumentada durante o curso da LC e LM e há significativa frequência de células IL-17+ nas lesões causadas por *L. (V.) braziliensis* (cerca de 40% das células dentro do infiltrado inflamatório), atribuindo à essa citocina um papel na patogênese da reação inflamatória na leishmaniose. Houve correlação direta entre IL-17 e $\text{TNF}\alpha$ e correlação inversa entre a produção de IFN γ e IL-17 (Bacellar et al. 2009). Como o $\text{TNF}\alpha$ tem sido considerado uma importante molécula na patologia associada a LC e LM, a direta correlação entre $\text{TNF}\alpha$ e IL-17 dá suporte ao papel da IL-17 e indiretamente, da IL-6, no dano tecidual da LCL.

Nós não observamos uma correlação entre o tamanho da lesão e as concentrações de IL-6, $\text{TNF}\alpha$ e IL-10. Num estudo envolvendo pacientes com LC provenientes de área endêmica de *L. (V.) braziliensis*, PBMCs foram estimuladas com SLA ou concanavalina A e os níveis de $\text{TNF}\alpha$, IL-10 e IFN γ foram avaliados nos sobrenadantes das culturas após 24, 48 ou 96 horas, respectivamente, e correlacionados com o tamanho da lesão ao diagnóstico dos pacientes. Observou-se

uma correlação positiva entre a produção de $\text{TNF}\alpha$ e o tamanho da lesão, mas não houve correlação entre o tamanho da lesão e a produção de IL-10 ou $\text{IFN}\gamma$, sugerindo uma contribuição do $\text{TNF}\alpha$ para a ulceração e a severidade da lesão (Oliveira et al. 2011). As diferenças entre o presente estudo e este podem ser devidas ao número de pacientes (três vezes menor no presente estudo) e tempo de cultura (menor no presente estudo). Em hemoculturas a produção de $\text{TNF}\alpha$ é rápida, com um pico de concentração da citocina, nos sobrenadantes das culturas, em 6 h após a estimulação. É possível que alterações nas concentrações de $\text{TNF}\alpha$ entre 6 h e 24 h possam criar um viés nas análises e leve a perda de correlações. Nossos dados mostraram tendência a uma correlação negativa entre o tamanho das lesões e as concentrações de IL-10, nas hemoculturas estimuladas com Pam₃Cys, Ag e MDP; o que pode ser esperado, pois, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que previne a superprodução de $\text{TNF}\alpha$, evitando dano tecidual (Ribeiro-de-Jesus et al. 1998). No entanto, ela pode exacerbar o crescimento dos parasitos, dificultando sua eliminação (Saraiva & O'garra 2010). As baixas concentrações de IL-10 estão associadas à falta de controle do processo inflamatório e ao aumento de lesões na LTA (Gaze et al. 2005). O aumento de IL-10 está relacionado à redução da lesão tecidual (Oliveira et al. 2011).

Foi verificado, neste estudo, que não houve uma correlação entre o tempo de lesão ao diagnóstico e as concentrações de IL-6, $\text{TNF}\alpha$ e IL-10, mas houve tendência a uma correlação positiva entre o tempo de lesão e IL-10, nas hemoculturas sem estímulo ou com o estímulo MDP, ou seja, nas lesões mais antigas a produção dessa citocina foi maior. Para o nosso conhecimento não foram encontrados relatos de correlação entre o tempo de lesão ao diagnóstico e produção de citocinas na leishmaniose. No entanto, podemos sugerir que níveis mais elevados de IL-10 *in vivo* possam estar associados às dificuldades de controle dos parasitos devido às propriedades imunossupressoras desta citocina.

Quando comparados os pacientes clinicamente curados após um ciclo de medicamento e aqueles clinicamente curados após mais de um ciclo de medicamento em relação à produção de IL-6, foi observado que esta foi mais elevada nas hemoculturas com o estímulo MDP (ativação via NOD2), dos pacientes curados com mais de um ciclo de medicamento. Estes dados sugerem um papel patogênico para essa citocina na leishmaniose, indicando que os pacientes que

apresentarem ao diagnóstico uma elevada produção de IL-6, poderão ter uma doença mais grave, com mais difícil tratamento. A análise imunoistoquímica de biópsias de pacientes com LTA, provenientes de área endêmica de *L. (V.) braziliensis*, obtidas antes da terapia com N-metil glucamine mostrou maior expressão de células IL-17 nos pacientes com LC que apresentaram pior resposta à terapia (Rodrigues et al. 2011). Na LC, a IL-17 parece contribuir para a persistência da inflamação em modelos experimentais com *L. major* (Anderson et al. 2009; Kostka et al. 2009). Estes dados corroboram com os do presente estudo, uma vez que para o desenvolvimento do perfil Th17 é importante a produção de IL-6. Nas leishmanioses, o papel do perfil Th17 ainda não foi totalmente esclarecido. Por outro lado, apesar de dados sugerindo um papel imunopatogênico para a IL-17, Novoa et al. (2011) detectaram IL-17 em indivíduos infectados, mas que não desenvolveram a doença, o que sugere um papel para a IL-17 na resistência à infecção. Além disto, foi demonstrado que a IL-17 tem um efeito protetor na leishmaniose visceral (Pitta et al. 2009), causada por *L. donovani* e na infecção experimental com *L. infantum/chagasi*, via modulação de IL-10 e potencialização da produção de NO *in vitro* e *in vivo* (Nascimento et al. 2015).

Em relação às concentrações de $\text{TNF}\alpha$ e IL-10 não foram detectadas diferenças significantes entre o grupo de pacientes curados com apenas um ciclo de medicamento e o grupo de curados com mais de um ciclo de medicamento. Num estudo envolvendo pacientes com LCL (única lesão ulcerada com duração de até 30 dias), os pacientes foram divididos em dois grupos: o grupo 1, com completa cura da lesão em até 60 dias após início do tratamento com glucantime e o grupo 2, com lesão ativa após 60 dias do início do medicamento. As citocinas $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ foram avaliadas em sobrenadantes de culturas de linfócitos estimuladas com antígeno solúvel de leishmânia por 48 horas; antes e 60 dias após o início do tratamento. Foi observado que os níveis de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ antes do tratamento no grupo 1 foram similares aos do grupo 2, semelhante ao observado no presente estudo. Após terapia, também não houve diferença significativa entre os grupos quanto à produção destas citocinas. Quando a produção de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ antes e após tratamento, foram comparadas dentro de cada grupo, notou-se que os níveis de $\text{IFN}\gamma$ aumentaram no grupo 1 após a terapia, mas sem significância estatística; enquanto, que os níveis de $\text{TNF}\alpha$ caíram, significativamente, após o tratamento em ambos os

grupos (D' Oliveira-Junior et al. 2002). Os dados sugerem que pacientes capazes de modular a resposta e diminuir a produção de $\text{TNF}\alpha$ após a terapia apesar do aumento da produção de $\text{IFN}\gamma$ são aqueles com maior probabilidade de serem curados. É possível que o resultado clínico possa ser mais relacionado à capacidade do hospedeiro de modular a resposta inflamatória do que com a magnitude da resposta imunológica antes da terapia.

Os resultados obtidos, no presente trabalho, sugerem que os monócitos de pacientes com LCL respondem a ativação via TLR2, TLR4 e NOD2, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, $\text{TNF}\alpha$) e anti-inflamatória (IL-10). A IL-6 pode estar associada à lesão tecidual e a demora na cura dos pacientes, possuindo um papel imunopatogênico na LCL humana. No entanto, deve ser avaliado um número maior de amostras para que conclusões mais fidedignas possam ser obtidas.

A utilização de compostos agonistas de TLR pode ser uma estratégia promissora na modulação da resposta imune e como adjuvante em vacinas. O AraLAM (*Arabinosylated lipoarabinomannan*) ativa TLR2 levando a produção de citocinas pró-inflamatórias e proteção contra LV (Bhattacharya et al. 2010). A ativação de TLR4, durante a imunoterapia da leishmaniose, tem sido associada com o aumento na taxa de cura em modelos animais (Baldrige et al. 2004; Calvopina et al. 2006; Reed et al. 2009; Raman et al. 2010). A vacinação subcutânea com adjuvantes agonistas dos TLR7 e TLR8 suprime a resposta Th2 e promove uma forte resposta Th1 (Zhang & Matlashewski 2008). Portanto, o estudo da ativação dos TLRs por seus agonistas e da subsequente produção de citocinas pode levar ao desenvolvimento de novas terapias e vacinas, o que é importante, visto que, não há uma vacina eficaz para LTA, os fármacos usados causam diversos e graves efeitos colaterais e está surgindo resistência dos parasitos aos fármacos.

7 CONCLUSÕES

Conclusões específicas:

- Houve produção significativa de IL-6, TNF α e IL-10, nas hemoculturas dos pacientes e dos controles, após estimulação com LPS, Pam, Ag ou MDP; mostrando que TLR4, TLR2 e NOD2 podem ser estimulados em leucócitos, especialmente em monócitos na infecção por leishmânia.

- Ao comparar pacientes e controles, em relação aos diferentes estímulos, não foram detectadas diferenças significantes quanto à produção de TNF α e IL-10; porém, houve maior produção de IL-6 nas hemoculturas dos pacientes não estimuladas e nas estimuladas com MDP (agonista de NOD2).

- A combinação dos estímulos Pam/MDP aumentou, significativamente, a produção de IL-6, TNF α e IL-10 nas hemoculturas dos pacientes e controles, em relação a cada estímulo sozinho; de maneira similar, Ag e MDP juntos aumentaram as concentrações destas citocinas (IL-6 e IL-10, especialmente nas hemoculturas dos pacientes).

- Não houve correlação significativa entre o número de lesões, o tamanho das lesões e o tempo de lesão ao diagnóstico dos pacientes com LCL e as concentrações de IL-6, TNF α e IL-10.

- Pacientes que não apresentam cura clínica após um ciclo de tratamento, produzem quantidades mais elevadas de IL-6 em hemoculturas ativadas com MDP/NOD2 do que pacientes que curam após um ciclo de terapia.

Conclusão geral:

Os monócitos de pacientes com LCL podem ser ativados via TLR2, TLR4 e NOD2, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF α) e anti-inflamatória (IL-10) e a IL-6 pode estar associada ao dano tecidual e a demora na cura dos pacientes, possuindo um papel imunopatogênico na LCL humana.

REFERÊNCIAS

Abeles RD et al. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14(hi)/CD16(neg) monocytes: Expansion of CD14(hi)/CD16(pos) and contraction of CD14(lo) /CD16(pos) monocytes in acute liver failure. *Cytometry Part A. International Society for Advancement of Cytometry*, 2012.

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8: 942–949, 2007.

Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol* 84(2):389–96, 2008. [PubMed: 18483206]

Almeida LS, Santos JB. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *An Bras Dermatol* 86, 2011.

Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, the WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One* 7: e35671, 2012.

Amato VS, de Andrade HF, Duarte MI. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta tropica* 85: 39-49, 2003.

Anderson CF, Stumhofer JS, Hunter CA, Sacks D. IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ cells in non healing *Leishmania major* infection. *J Immunol* 183: 4619-4627, 2009.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269-1281, 2000.

Assier E, Boissier MC, Dayer JM. Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint Bone Spine* 77: 532-536, 2010.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734–40, 2002. [PubMed: 12438348]

Bacellar O. et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 200: 75–78, 2009.

Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, Cluff C, Mossman S, Johnson D, Persing D. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert opinion on biological therapy* 4: 1129-1138, 2004.

Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. More stories on Th17 cells. *Cell Research* 19(4): 399–411, 2009.

Bhattacharya P, Bhattacharjee S, Gupta G, Majumder S, Adhikari A, Mukherjee, A, Majumdar SB, Saha B, Majumdar S. Arabinosylated lipoarabinomannan-mediated protection in visceral leishmaniasis through up-regulation of toll-like receptor 2 signaling: an immunoprophylactic approach. *The Journal of infectious diseases* 202: 145-155, 2010.

Becker I, Salaiza N, Aguirre M, et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 130(2):65e74, 2003.

Belkaid Y, Butcher B, et al. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *European Journal of Immunology* 28(4): 1389-400, 1998.

Belkaid Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opin Biol Ther* 3(6): 875-85, 2003.

Birnbaum R, Craft N. Innate immunity and *Leishmania* vaccination strategies. *Dermatol Clin* 29(1):89-102, 2011 doi: 10.1016/j.det.2010.08.014.

Blumenstein M, Boekstegers P, Fraunberger P, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle-Rowson G. Cytokine production precedes the expansion of CD14+CD16+ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* 8: 73, 1997.

Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, Andrade J, Dos Santos WLC, 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 Jour Immunol*. 40: 2830-2836, 2010.

Bourreau E, Pre´Vot G, Gardon J, Pradinaud R, Launois P 2001. High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. *The Journal of Infectious Diseases* 184: 1628–30, 2001.

BRASIL. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana. 1º ed. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_lta.pdf. Acessado em abril de 2016.

Brujin MHL, Barker DC. Diagnosis of New World Leishmaniasis: specific detection of species of the *L. braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica* 52: 45-58, 1992.

Brunialti, MKC et al. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock* 25: 351-357, 2006.

Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 91: 500-505, 1993.

Calvopina M, Barroso PA, Marco JD, Korenaga M, Cooper PJ, Nonaka S, Hashiguchi Y. Efficacy of vaccination with a combination of *Leishmania* amastigote antigens and the lipid A-analogue ONO-4007 for immunoprophylaxis and immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in a murine model of New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 24: 5645-5652, 2006.

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* 193: 1313-1322, 2006.

Carvalho JSM. Caracterização de frações antigênicas de *Leishmania braziliensis* e avaliação da resposta imune em pacientes com Leishmaniose Tegumentar. Salvador. [Dissertação de Mestrado em Imunologia - ICS/UFBA], 2004.

Carvalho LP, et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentar leishmaniasis. *Frontiers Immunology* 3, 2012.

Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A, Rodrigues V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Human Immunology* 70: 383-390, 2009. Doi:10.1016/j.humimm.2009.01.007

Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis* 194: 519–527, 2006.

Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J. Biomed. Biotechnol*, 2010.

Convit J, Kerdel-Vegas F. Disseminated cutaneous leishmaniasis. *Archives of Dermatology* 91: 439-447, 1965.

Convit J, Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Caceres Dittmar G, Castes M, Rondon AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 444-448, 1993.

Costa JML, Saldanha ACR, Silva ACM, Serra-Neto A, Galvão CES, Silva CMP, Silva AR. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão. II. Aspectos epidemiológicos e clínico-evolutivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25: 115-123, 1992.

Costa RSS. Contribuição das diferentes subpopulações de monócitos para a resposta inflamatória na leishmaniose cutânea. Salvador [Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde – FMB| UFB], 2012.

Couppié P, et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. *Am J Trop Med Hyg* 71: 558-560, 2004.

Cros J et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375-386, 2010.

Damsgaard CT, Lauritzen L, Calder PC, Kjaer TMR, Frokiaer H. Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines - a comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes. *J Immunol Methods* 340: 95-101, 2009. OK

de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol* 33(10): 2822-2831, 2003.

Diaz NL, Arvelaez FA, Zerpa O, Tapia FJ. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 31: 114-117, 2006.

D'Oliveira Junior A, Machado P, Bacellar O, Cheng LH, Almeida RP, Carvalho EM. Evaluation of IFN- γ and TNF- α as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35(1): 7-10, 2002.

Domingos PLB, Viana AG, Fraga CAC, Bonan PRF. Ox 40+ T lymphocytes and IFN γ are associated with American Tegumentary leishmaniasis pathogenesis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. Montes Claros-MG, 2012.

Dominguez M, Moreno I, Aizpurua C, Torano A. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes Infect* 5: 507-513, 2003.

Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Jr Schrieffer 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* 73: 7853-7859, 2005.

Farina C, Theil D, Semlinger B, Hohlfeld R. Distinct responses of monocytes to toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *IntImmunol* 16(6): 799-809, 2004.

Fokkema SJ. Peripheral blood monocyte responses in periodontitis. *Int. J. Dent. Hyg* 10: 229–235, 2012.

Furtado T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado-Pinto J(ed), Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro 319-328, 1994.

Galdino Jr. H, Gomes RS, dos Santos JC, Pessoni LL, Maldaner AE, Marques SM, Gomes CM, Dorta ML, de Oliveira MAP, Joosten LAB, Ribeiro-Dias F. *Leishmania*

(*Viannia*) *braziliensis* amastigotes induces the expression of TNF α and IL-10 by human peripheral blood mononuclear cells in vitro in a TLR4-dependent manner. *Cytokine* 88: 184–192, 2016.

Garg H, Trudel N & Trembley MJ. Consequences of the natural propensity of *Leishmania* and HIV-1 to target dendritic cells. *Trends Parasitol* 23: 317–324, 2007.

Gaze ST, et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scandinavian journal of immunology* 63: 70–78, 2005.

Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimaraes LH, Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T cell phenotype associated with a non balanced monocyte population. *Scand J Immunol* 63: 70-78, 2006.

Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O'Shea JJ. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 467: 967-971, 2010.

Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. *Parasite Immunol.* 36(8): 367–376, 2014. doi:10.1111/pim.12100.

Gomes CM, Avila LR, Pinto SA, Duarte FB, Pereira LIA, Abrahamsohn IA, Dorta ML, Vieira LQ, Ribeiro-Dias F, Oliveira MAP. *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1b, IL-6, IL-10 and TGF-b by peripheral blood mononuclear cells from non endemic area healthy residents. *Parasite Immunology* 36: 225–231, 2014.

Gomes-Silva A, de Cassia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. Can interferon gamma and

interleukin10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* 149: 440-444, 2007.

Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J. Exp. Med.* 208: 1253–1265, 2011.

Gontijo B, de Carvalho ML. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 7180, 2003.

Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 419-433, 2010.

Green SJ, et al. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of immunology* 144(1): 278–83, 1990.

Gueirard P, Laplante A, Rondeau C, et al. "Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages." *Cellular Microbiology* 10(1): 100–111, 2008.

Guerra JÁ, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa MG, Ferreira LC. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) brasiliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 5 e980, 2011.

Guimaraes-Costa AB, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl Acad.* 106: 6748–6753, 2009.

Hawrylowicz CM. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J Exp Med* 202: 1459-1463, 2005.

Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelen J, Miron C, Alonso C, Corraliza I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines,

supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite immunology* 24: 113-118, 2002.

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* 136: 1193–1199, 2009.

Kemp K, Theander TG, Hviid L, Garfar A, Kharazmi A, Kemp M. Interferon gamma- and tumour necrosis factor-alpha producing cells in humans who are immune to cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol.* 49(6): 655-9, 1999.

Kimura A, Kishimoto T. Th17 cells in inflammation. *Int Immunopharmacol* 11: 319-322, 2011.

Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijersc F, Joosten LAB, Ifrim DC, Saeedd S, Jacobs C, van Loenhoute J, de Jongf D, Stunnenbergd HG, Xaviere RJ, van derMeer JWM, van Crevel R, Netea MG. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *PNAS* 109(43): 17537–17542, 2012.

Korn T, Oukka M, et al. "TH17 cells: Effector T cells with inflammatory properties." *Seminars in Immunol* 19(6): 362-371, 2007.

Kostka SL, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J. Immunol.* 182: 3039-3046, 2009.

Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, et al. Toll like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 72(4):1920e8, 2004.

Laskay T, van Zandbergen G, W. Solbach W. "Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor". *Immunobiology* 213(3-4): 183–191, 2008.

Laufs H, Muller K, Fleischer J, et al. "Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors." *Infection and Immunity* 70(2): 826–835, 2002.

Liew FY, et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of immunology* 144(12): 4794–7, 1990.

Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva ALN, Mineo TWP, Gutierrez FRS, Bellio M, Bortoluci KR, Flavell RA, Bozza MT, Silva JS, Zamboni DS. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nature Medicine* 19: 909–915, 2013 doi:10.1038/nm.3221.

Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J. Immunol.* 182: 3039–3046, 2009.

Machado PR, Rosa ME, et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene* 105(8): 438-44, 2011.

Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentas EA, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania b. braziliensis*. Padrões histológicos e estudo evolutivo das lesões. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 28: 253-262, 1986.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene* 80(6): 859-76, 1986.

Marzochi MC. A Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Journal Brasileiro de Medicina* 63: 82-104, 1992.

Mendonca SCF, Sousa WJS, Nunes MP, Marzochi MCA, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83: 347-355, 1988.

Miles EA, Allen E, Calder PC. In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon fatty acids on production of monocyte-derived cytokines in human whole blood cultures. *Cytokine* 20: 215–223, 2002.

Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2007. 2º Edição. 182p. Ed. Ministério da Saúde (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf).

Montenegro J. Cutaneous reactions in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology* 13: 187,1926.

Morgado FN, Schubach A, Rosalino CM, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, Conceicao-Silva F. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *The British journal of dermatology* 158: 50-58, 2008.

Mucida D, Cheroutre H. TGFbeta and retinoic acid intersect in immune-regulation. *Cell Adh Migr* 1: 142-144, 2007.

Nascimento MSL, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, de Jesus A, de Almeida RP, da Silva JS. Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon γ to Promote Protection Against *Leishmania infantum* Infection. *J Infect Dis* 211 (6): 1015-1026, 2015.

Nascimento MSL, Ferreira MD, Quirino GFS, Maruyama SR, Krishnaswamy JK, Liu D, Berlink J, Fonseca DM, Zamboni DS, Carregaro V, Almeida RP, Cunha TM, Eisenbarth SS, Silva JS. NOD2-RIP2-mediated signalling contributes to shape adaptive immunity in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 214 (11): 1647-1657, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw446>

Nathan CF, Hibbs Jr JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology* 3(1): 65-70, 1991.

Neves D. *Parasitologia Humana*. 12. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2011.

Novais FO, et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J. Infect. Dis.* 209: 1288–1296, 2014.

Novoa R, et al. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. *Parasite Immunology* 33(2): 132–136, 2011.

Oliveira F, et al. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 85: 70-73, 2011.

Oliveira MAP, et al. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev Inst Med Trop* 52: 83- 88, 2010.

Oliveira WNF. Regulação da resposta inflamatória na Leishmaniose Tegumentar: papel de IL-10, TGF- β e IL-27. Salvador [Dissertação de Mestrado em Imunologia – ICS|UFB], 2012.

Organizacion Mundial de la Salud – Lucha contra lãs leishmaniasis. Ginebra, OMS, 178p. (Série de Informes Técnicos,793) 1990.

Passos S, et al. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections. *Journal of Infections Diseases*, 2015.

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 22: 1-13, 1996.

Pereira LIA, Dorta ML, Pereira AJCS, Bastos RP, Oliveira MAP, Pinto SA, Galdino Jr H, Mayrink W, Barcelos W, Toledo VPCP, Lima GMCA, Ribeiro Dias F. Case report: increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens. *Am J TropMedHyg* 81: 378383, 2009.

Pereira LIA. Avaliação dos monócitos na Leishmaniose Tegumentar Americana. Goiânia. [Tese de doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública - IPTSP/UFG], 2012.

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* 91: 1390-1395, 1993.

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* 119: 2379–2387, 2009.

Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 70: 4638–4642, 2002.

Raman VS, Bhatia A, Picone A, Whittle J, Bailor HR, O'Donnell J, Pattabhi S, Guderian JA, Mohamath R, Duthie MS, *et al.* Applying TLR synergy in immunotherapy: implications in cutaneous leishmaniasis. *Journal of immunology* 185: 1701-1710, 2010.

Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in immunology* 30: 23-32, 2009.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581–96, 2007.

Rey L. *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 31: 143-148, 1998.

Rodrigues KMP, Oliveira MP, Maretti-Mira AC, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Silva L, Soares DA, Dolci ELL, Perico RAPN, Pirmez C. Influence of the Notch system in the therapeutic response of American tegumentary leishmaniasis. *British Journal of Dermatology* 164: 1228–1234, 2011.

Sabroe EC, et al. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *Journal Immunology* 168: 4701-4710, 2002.

Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature* 10: 170-180, 2010.

Schildberger A, et al. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm*: 697-972, 2013.

Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews*, 2016. doi:[10.1038/nri.2016.72](https://doi.org/10.1038/nri.2016.72)

Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 69: 323-335, 1975.

Shaw J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(5): 541-547, 2007.

Silveira Jr. L, Paleckis LG, Nicolau RA, Nogueira GV, Busanello RZ, Mardegan DA, Fonseca SM, Zangaro RA, Pacheco MT.[Detection of induced neoplastic lesions in the oral mucosa of hamsters using fluorescence spectroscopy]. *Rev Assoc Med Bras* 50: 297-301, 2004.

Silveira FT, Lainson R, Castro Gomes CM, Laurenti, MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) brasiliensis* and *L. (L.)*

amazonensis in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 423-431, 2009.

SINAN/SVS/MS. *Relatório de Situação Goiás*. 5ed. ed. Brasília DF. p. 16, 2011.

SINAN/SVS/MS. *Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net*. Disponível em: <www2.datasus.gov.br>. Acesso em: 17 fev. 2014.

Smedman C. et al. Spot analysis of LPS-stimulated leukocytes: human granulocytes selectively secrete IL-8, MIP-1beta and TNF-alpha. *Journal of Immunological Methods* 346: 1-8, 2009.

Soares G, et al. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *J LeukocBiol* 79: 36-39, 2006.

Soong L. Modulation of dendritic cell function by Leishmania parasites. *J Immunol* 180: 4355–4360, 2008.

Soong L, Henard CA, Melby PC. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol* 34: 735–751, 2012.

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* 76(2): 175-80, 2012.

Sun J, Ding Y. NOD2 Agonist Promotes the Production of Inflammatory Cytokines in VSMC in Synergy with TLR2 and TLR4 Agonists. *The Scientific World Journal*, 2012. doi:10.1100/2012/607157

Tada H, Aiba S, Shibata K-I, Ohteki T, Takada H. Synergistic Effect of Nod1 and Nod2 Agonists with Toll-Like Receptor Agonists on Human Dendritic Cells To

Generate Interleukin-12 and T Helper Type 1 Cells. *Infection and Immunity*: 7967–7976, 2005.

Tuon FF, Fernandes ER, Pagliari C, Duarte MI, Amato VS. The expression of TLR9 in human cutaneous leishmaniasis is associated with granuloma. *Parasite Immunol.* 32(11-12): 769-72, 2010.

Tuon FF, Fernandes ER, Duarte MIS, Amato VS. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary american leishmaniasis. *Rev Inst Med trop* 54(3), 2012 <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652012000300008>

Turetz ML, Machado PR, Ko AL, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Junior, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: A New and Emerging Form of leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. *J Infect Dis* 186 (12): 1829-1834, 2002 doi: 10.1086/345772

Uehara A, Yang S, Fujimoto Y, et al. “Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cellular Microbiology* 7: 53–61, 2005.

van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, et al. “Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages.” *Journal of Immunology* 173(11): 6521–6525, 2004.

Vega-Lopez F. Diagnosis of cutaneous Leishmaniasis. *Curr Opin Infec Dis.* 16: 97-101, 2003.

Veras PRV. Avaliação dos monócitos de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana antes e após o tratamento. Goiânia [Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública - IPTSP/ UFG], 2015.

Viana AG, de Souza FV, de Paula AMB, Silveira MF, Botelho ACC. Aspectos clínico-epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Med Minas Gerais* 22(1): 1-128, 2012.

Vouldoukis I, Becherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debre P, Mazier D, Mossalayi MD. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *European journal of immunology* 27: 860-865, 1997.

Xin L, Li Y, Soong L. Role of interleukin-1 β in activating the CD11c(high) CD45RB-dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4⁺ T cells in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 75: 5018–5026, 2007.

Xing L, Remink DG. Neutrophils as firemen, production of anti-inflammatory mediators by neutrophils in a mixed cell environment. *Cel Immunol* 231: 126-132, 2005.

Zawada AM, et al. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50-61, 2011.

Zhang WW, Matlashewski G. Immunization with a Toll-like receptor 7 and/or 8 agonist vaccine adjuvant increases protective immunity against *Leishmania major* in BALB/c mice. *Infection and immunity* 76: 3777-3783, 2008.

Ziegler – Heitbrock L, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116: e74-80, 2010.

Wardowska A, Dzierzbicka K, Menderska A, Trzonkowski P. New conjugates of tuftsin and muramyl dipeptide as stimulators of human monocyte-derived dendritic cells. *Protein Pept Lett* 20(2): 200-4, 2013.

Wong KL, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118: e16-31, 2011.

World Health Organization. *Leishmaniasis: Situation and trends*. Disponível em:

<http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.html>.

Acesso em: 12 dez. 2013

Wu W, Huang L, Mendez S. A live *Leishmania major* vaccine containing CpG motifs induces the de novo generation of Th17 cells in C57BL/6 mice. *Eur J Immunol* 40: 2517–2527, 2010.

Yang S, Tamai R, Akashi S, Takeuchi O, Akira S, Sugawara S, Takada H. Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect Immun* 69: 2045–2053, 2001.

ANEXOS

ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA, TCLE

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos monócitos de pacientes com diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

Pesquisador: Fátima Ribeiro-Dias

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59615915.4.0000.5078

Instituição Proponente: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.783.791

Apresentação do Projeto:

Em geral, os pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL) apresentam resposta imune celular contra Leishmania, avaliada por intradermoreação, bem como resposta imune humoral (Convit et al., 1993). Na forma mais grave da LTA, causada especialmente por *L. (V.) braziliensis*, a leishmaniose mucosa (LM), os pacientes apresentam forte resposta imune celular concomitante a uma progressiva destruição tecidual. A resposta na intradermoreação com antígenos de Leishmania é mais forte do que a de pacientes com LCL (Convit et al., 1993). Em resposta a antígenos de Leishmania, os linfócitos de pacientes com LM produzem altas quantidades de IFN gama e TNF e baixa de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, que inibe os efeitos do IFN gama e a atividade microbicida dos macrófagos (Belkaid et al., 2001; Bacellar et al., 2002; Tripathi et al., 2007). Em condições fisiológicas podem ser detectadas três subpopulações de monócitos no sangue periférico humano: os clássicos (CD14hiCD16-), os intermediários (CD14hiCD16+) e os não clássicos (CD14lowCD16+), porém durante os processos inflamatórios pode haver alteração nas subpopulações dos monócitos (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Além de estarem aumentados em condições inflamatórias, os monócitos CD16+ também aumentam durante o curso de algumas infecções, tanto infecções localizadas quanto na sepse (Ziegler-Heitbrock, 2007). Na leishmaniose, na forma LCL, foi

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.783.791

demonstrado que os pacientes

apresentam um elevado número de monócitos CD16+ e uma maior intensidade de expressão do CD16 nestes monócitos, quando comparados com controles sadios (Soares et al., 2006). Estes monócitos expressam mais TLR2 do que os monócitos clássicos, tanto em indivíduos sadios (Belge et al., 2002), quanto em pacientes com artrite (Iwahashi et al., 2004). Nos pacientes, tanto os monócitos CD16+ quanto os macrófagos sinoviais CD16+ expressam elevados níveis de TLR2 e em resposta a um agonista deste receptor produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Iwahashi et al., 2004). Neste estudo, foi demonstrada uma correlação entre o número dos monócitos CD16+ e o tamanho da lesão ao diagnóstico, bem como com os níveis plasmáticos de TGFbeta. Por isso, conhecer os fatores etiopatogênicos da LTA torna-se relevante, na medida em que abre novas perspectivas para avanços na prevenção e tratamento da LTA. No ano 2009, após anos de acompanhamento e análises imunológicas de um paciente com leishmaniose cutânea difusa, descrevemos que a imunoterapia com BCG e Leishvacin causou um aumento de monócitos não clássicos, à época, ainda descritos como monócitos inflamatórios, em paralelo a uma excelente resposta clínica (Pereira et al., 2009). Por isso conhecer os fatores etiopatogênicos da LTA torna-se relevante, na medida em que abre novas perspectivas para avanços no tratamento e prognóstico da doença.

Os pacientes serão atendidos no ambulatório de Endemias/HDT (Hospital Anuar Auad, Centro de referência de leishmanioses no Estado de Goiás) para diagnóstico clínico, obtenção da biópsia, tratamento e acompanhamento. Para a coleta de amostra para realização dos experimentos, serão incluídos na pesquisa os pacientes que tiverem entre 18 a 65 anos, diagnosticados com LTA e que estejam em bom estado de saúde geral avaliados pelo médico supervisor. Durante a consulta médica realizada no ambulatório do HDT, após a anamnese do médico responsável, o paciente que preencher os critérios de inclusão na pesquisa, será convidado a participar da mesma. O pesquisador prestará informações em linguagem clara e acessível. Serão informados ao paciente os objetivos da pesquisa, o tipo de material coletado, bem como os riscos e benefícios. O paciente será informado que, independente de sua participação na pesquisa o tratamento será realizado seguindo os critérios da saúde pública e que o mesmo não receberá nenhuma remuneração e não terá ônus por sua participação. O paciente poderá sair da pesquisa a qualquer momento e seus dados pessoais serão todos mantidos em sigilo em todo tempo. Ao aceitar participar como voluntário, o mesmo irá ler e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes da coleta. Serão coletados 15 ml sangue periférico por punção venosa. Após a coleta o paciente ficará

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cephucfg@yahoo.com.br

Página 02 de 12

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.783.791

em observação e cuidado do pesquisados por 3 minutos, a fim de evitar formação de hematoma no local da coleta. Para a coleta dos indivíduos saudáveis, serão seguidos os mesmos procedimentos utilizados para os pacientes. Serão incluídos os indivíduos saudáveis que tiverem o mesmo gênero e idade do paciente recrutado no dia. A coleta dos indivíduos saudáveis será realizada após o recrutamento do paciente. Serão convidados a participar os doadores de sangue dos bancos de sangue do INGOH e HC. As coletas das amostras serão realizadas por pesquisadores habilitados para os procedimentos. Os materiais utilizados na coleta serão todos descartáveis. Em caso de hematoma será feita compressão local por 5 minutos com gelo; extravasamento de sangue será feita compressão do local por 5 minutos e alergia por álcool encaminhamento ao médico supervisor do ambulatório

Critério de Inclusão:

Serão incluídos pacientes diagnosticados com LTA (dados epidemiológicos e exame clínico associados com a positividade de um dos exames laboratoriais: intradermorreação de Montenegro (IDRM), análises histopatológicas, com detecção de formas amastigotas confirmadas por imunoistoquímica, reação da polimerase em cadeia (PCR, Polymerase Chain Reaction) mkPCR, e reação de imunofluorescência indireta).

Participantes entre 18 a 65 anos, com bom estado de saúde geral. Serão incluídos indivíduos saudáveis que forem aos bancos de sangue (HC e INGOH) para doação de sangue, que tenham idade igual ou com variação de cinco anos a mais ou a menos do paciente do dia. A avaliação para aptidão em participar da pesquisa; tanto dos pacientes quanto dos indivíduos saudáveis será realizada pelo médico assistente.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos pacientes com LTA que fizeram uso de medicação para tratamento da doença, tais como Pentoxifilina, Anfotericina e Glucantime, no período inferior a seis meses da data da consulta.

O número de pacientes e controles dependerá do tipo dos diferentes experimentos, estimando-se no período de três anos, que sejam avaliados 40 pacientes (20 com LC e 20 com LM) e indivíduos sadios (n = 40,

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cephcufig@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.783.791

Doadores do Banco de Sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia). Pacientes e controles serão pareados por gênero e idade, sendo que todos lerão e assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de doarem o sangue. Para os experimentos com monócitos isolados serão realizados de seis a 11 experimentos com um paciente e um controle cada, em cada tipo destes experimentos. Serão incluídos pacientes diagnosticados com LTA (dados epidemiológicos e exame clínico associados com a positividade de um dos exames laboratoriais: intradermoreação de Montenegro (IDRM), análises histopatológicas, com detecção de formas amastigotas confirmadas por imunoistoquímica, reação da polimerase em cadeia (PCR, Polymerase Chain Reaction) mkPCR, e reação de imunofluorescência indireta). Serão excluídos pacientes e controles com idade inferior a 18 e superior a 60 anos ou que já estejam fazendo uso de qualquer medicação. Os pacientes serão atendidos no ambulatório de Endemias/HDT (Hospital Anuar Auad, Centro de referência de leishmanioses no Estado de Goiás) para diagnóstico clínico, obtenção da biópsia, tratamento e acompanhamento.

TRATAMENTO E ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES, CRITÉRIOS DE CURA E GRAVIDADE:

Após o diagnóstico, os pacientes serão tratados, sendo o fármaco de primeira escolha, o antimonial petavalente (antimoniato de N-metil glucamina, Glucantime, Aventis, SP, Brasil; 20 mg/kg/dia/30 dias) e de segunda escolha, a anfotericina B (Anforicin B, Cristália, SP, Brasil; dose total de 1.700 mg). Serão considerados curados os pacientes com cicatrização das lesões, associada com negatificação da reação de imunofluorescência indireta depois de seis (LC) ou 12 (LM) meses de acompanhamento. E não curados, aqueles com persistência das lesões e/ou reação de imunofluorescência indireta $>1/40$.

Crítérios para gravidade da doença: tamanho das lesões, número de lesões, tempo de evolução das lesões e IDRM não reagente após três meses de doença.

ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE DOS PARASITOS: Brevemente, as biópsias serão maceradas e inoculadas em meio Grace completo (Grace's Insect Medium, Sigma Chemical Co., St Louis, MD, EUA) suplementado com 20% Soro Fetal Bovino (SFB, Cripion, Andradina, SP, Brasil) inativado, 2 mM de L-glutamina (Sigma), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 100 g/mL de estreptomicina (Sigma). Os parasitos mantidos no Leishbank, em nitrogênio líquido,

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cephcufig@yahoo.com.br

Página 04 de 12

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.783.791

serão descongelados e cultivados segundo Oliveira et al. (2010). A determinação das espécies dos parasitos, dos isolados ou diretamente das biópsias, será feita por meio de PCRs, como descrito por Castilho et al. (2003), por Volpini et al. (2004) e por da Graça et al. (2012). As espécies de Leishmania serão utilizadas como referência.

OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS DE L. (V.) braziliensis:

Após cultivo do isolado MHOM/BR/2003/IMG (IMG3) por três dias em meio Grace, os parasitos serão lavados com PBS três vezes, centrifugando a 1000 g por 15 min, a 4°C. O sedimento será ressuspenso em PBS,

adicionado de inibidores de proteases (Coquetel de inibidores, Sigma) e os parasitos serão rompidos por cinco ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho-maria a 37°C). A quantidade de proteínas será dosada usando o BCATM protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, EUA), usando soro albumina bovina para estabelecer a curva padrão, sendo todos os procedimentos de acordo com as instruções do fabricante. Os antígenos serão adicionados na concentração de 50 µg/mL às hemoculturas e culturas de monócitos, como descrito abaixo.

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E HEMOCULTURAS:

O sangue periférico (20 mL) de indivíduos sadios e pacientes será colhido em tubos vacutainer (BD Vacutainer™, Juiz de Fora, MG, Brasil), contendo solução de heparina como anticoagulante, tanto para análise dos marcadores celulares quanto para as hemoculturas. Para avaliar a produção de citocinas, serão realizadas hemoculturas, sendo o sangue diluído em meio RPMI 1640 (v/v; (suplementado com 11 mM de bicarbonato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 g/mL de estreptomicina). As hemoculturas serão incubadas na ausência ou presença de antígenos dos parasitos (50 µg/mL), agonista de TLR4 (LPS, E. coli 0111:B4, Sigma, 100 ng/mL), de TLR2 (Pam3Cys SKKKK (EMC, Tübingen, Alemanha, 100 ng/mL), TLR3 (poly I:C, 50 µg/mL, Invivogen) e TLR8 (R848, 1 µg/mL, Invivogen). As hemoculturas serão incubadas por 6 h para avaliação da liberação de TNF e 24 h para todas as citocinas do kit CBA de inflamação (IL-1, IL-8, IL-6, TNF, IL-12p70, IL-10), nos sobrenadantes, conforme descrito abaixo.

ISOLAMENTO DE MONÓCITOS CD16+ E CD16- E LINFÓCITOS T CD4+ E CULTURAS PARA AVALIAR DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS:

Os monócitos do sangue periférico de pacientes ou controles serão isolados em duas populações

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cepcufg@yahoo.com.br

Página 05 de 12

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.783.791

principais, de acordo com a expressão do marcador CD16, utilizando-se kits de microesferas (Miltenyi Biotec), de acordo

com as instruções do fabricante. Brevemente, células mononucleares serão separadas em gradiente de Ficoll (G&E, Healthcare) a partir de sangue venoso heparinizado diluído em PBS (v/v). Das CMN serão retiradas as células NK (CD56 microesferas). Os monócitos CD16+ serão positivamente selecionados usando esferas CD16; em sequência, da população CD16-, os CD16- serão positivamente selecionados usando microesferas CD14. Os linfócitos T de indivíduos saudáveis serão selecionados positivamente com microesferas CD4.

Os monócitos isolados serão cultivados na ausência ou presença dos mesmos estímulos usados nas hemoculturas, como descrito acima. As co-culturas de monócitos e linfócitos (1:10; em meio RPMI 1640, suplementado como descrito acima, contendo 10% de soro humano) serão realizadas com base nos protocolos descritos por Napolitani et al. (2005) e Smeekens et al. (2011), sendo culturas de 6 dias, em placas de cultura de 96 poços. Após este período, as culturas serão tratadas com rIL-2 (30 U/mL, Sigma) por 48 h, seguido por ativação com éster de forbol miristato (PMA, 50 ng/mL, Sigma) mais ionomicina (1 µM, Sigma) por 6 h na ausência ou presença de brefeldina (10 µg/mL, Sigma). Sobrenadantes e células T serão colhidos para análises de citocinas extra e intracelulares, respectivamente, como descrito abaixo.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD14, CD16, TLR2, TLR3, TLR4 E TLR8

NOS MONÓCITOS E CITOCINAS INTRACELULARES: Para a imunofenotipagem dos leucócitos no sangue periférico, às alíquotas de 100 µL de sangue total fresco serão adicionados anticorpos monoclonais específicos para os marcadores CD86 (pan marcador de monócitos), CD14, CD16, TLR2, TLR3, TLR4 e TLR8 (marcados com fluorocromos) e anticorpos controles isotípicos.

CULTIVO DOS HIBRIDOMAS, PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTITNF E ANTI IL-10 E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TNF E IL-10 POR ELISA:

Para os ensaios de triagem das hemoculturas, antes da realização das dosagens de citocinas por kits CBA (BD Biosciences), serão realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para TNF (6 h) e IL-10 (24 h) com kits preparados no laboratório. Para a dosagem de TNF e IL-10 será usado um ensaio imunoenzimático.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cephcufig@yahoo.com.br

Página 06 de 12

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.783.791

AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS DE HEMOCULTURAS, CULTURAS DE MONÓCITOS E CO-CULTURAS DE SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS COM LINFÓCITOS T CD4+

As citocinas serão quantificadas nos sobrenadantes das culturas, usando kits CBA de inflamação (Human Inflammatory Cytokines Kit: IL-8, IL-1, IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70 - Catálogo 551811, BD Biosciences) e kits CBA para perfil Th (Human Th1/Th2/Th17 Kit - Avalia: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN, IL-17A- Catálogo 560484, BD Biosciences), conforme as instruções do fabricante. A dosagem de IL-23 será realizada por meio de kit comercial – Catálogo 88-7237-22, eBiosciences, de acordo com as instruções do fabricante.

DERIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBICIDA:

Após separação dos monócitos CD16+ e CD16-, como referido acima, 2 x 10⁵ células serão adicionadas sobre lâminulas redondas (13 mm) em placas de 24 poços (volume final 500 µL), para derivação para macrófagos, durante 4 dias. Os macrófagos serão pré-tratados com IFN (100 U/mL) por 24 h e, então, infectados com formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/2003/IMG (IMG3) em fase estacionária do crescimento, cultivados em meio Grace, como descrito acima. Macrófagos e parasitos (1:10) serão incubados por 4 h, lavados, o meio repostado e re-incubados até 48 h, na presença ou ausência de agonistas de TLR.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL: Avaliar fenotípica e funcionalmente as subpopulações de monócitos em pacientes com diferentes formas clínicas de LTA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1 Quantificar as subpopulações de monócitos CD14hiCD16-, CD14hiCD16+ e CD14loCD16+ no sangue periférico de pacientes com LTA nas formas clínicas cutânea (LC) e mucosa (LM), antes e após o tratamento, comparando com indivíduos saudáveis e estabelecendo correlação entre os resultados obtidos e os dados clínicos dos pacientes;
- 2 Avaliar a expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR8 nas subpopulações de monócitos de pacientes com LTA (LC e LM), antes e após o tratamento, comparando com indivíduos saudáveis;
- 3 Determinar a produção de citocinas pró e antiinflamatórias (IL-1, IL-8, IL-6, IL-12p70, TNF e

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

Página 07 de 12

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.783.791

IL-10} em culturas de sangue periférico de pacientes com LTA (LC e LM), antes e após o tratamento, estimuladas com antígenos totais de *L. (V.) braziliensis* ou agonistas de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR8, comparando as respostas com aquelas de indivíduos saudáveis;

4 correlacionar as frequências das três subpopulações de monócitos do sangue periférico, antes e depois do tratamento, com as concentrações das citocinas nas hemoculturas, bem como com a evolução clínico-terapêutica.

5 Avaliar a produção de citocinas em culturas de monócitos CD16+ e CD16- de pacientes e controles, estimuladas com agonistas de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR8 ou antígenos totais de *L. (V.) braziliensis*.

6 Avaliar a capacidade das subpopulações de monócitos CD16+ e CD16- de pacientes e controles, ativadas com agonistas de TLR2, TLR3, TLR4, TLR8 e antígenos totais de *L. (V.) braziliensis*, para induzir respostas Th1, Th2 e Th17.

7 Correlacionar as citocinas produzidas pelas diferentes populações de monócitos CD16+ e CD16- de pacientes e controles com o perfil de citocinas dos linfócitos Th, após cultivos com antígenos totais de *L. (V.) braziliensis*, na presença ou ausência de agonistas de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR8.

8 Avaliar a atividade microbida de macrófagos derivados de monócitos CD16+ e CD16- de pacientes e controles contra *L. (V.) braziliensis*, na presença ou ausência de agonistas de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR8.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Para os pacientes e indivíduos saudáveis, poderá ocorrer complicações locais após a punção venosa, tais como a formação de hematomas, extravasamento de sangue e reação alérgica ao produto usado na assepsia (álcool 70%). Estes riscos serão acompanhados pelo pesquisador responsável pela coleta. Em caso de ocorrência de algum deles, serão realizados os procedimentos adequados citados na metodologia.

Benefícios:

O pesquisador relata que os participantes deste estudo (pacientes e indivíduos saudáveis), não terão benefícios diretos; porém haverá muitos benefícios indiretos. Na pesquisa haverá determinação de marcadores prognósticos e evolução na LTA, que poderá inserir para a comunidade, novas formas de manejo da

doença. Novas ferramentas diagnósticas e alvos terapêuticos poderão ser propostos diante dos resultados esperados.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cepcufg@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.783.791

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A alteração de diferentes subpopulações de monócitos pode ser benéfica ou não, dependendo da forma clínica ou espécie de parasito causadora da infecção. O desequilíbrio entre as subpopulações de monócitos pode ser crucial para o controle ou a manutenção/gravidade da LTA, podendo servir como marcadores de prognóstico clínico. Também avaliar a expressão de TLR nos monócitos de pacientes com LTA e a capacidade das diferentes subpopulações de monócitos em responder aos agonistas destes receptores, com produção de citocinas, indução dos perfis de linfócitos Th e eliminação dos parasitos nos macrófagos deles derivados, é essencial para determinar quais são os mecanismos de controle dos parasitos, a fim de poderem-se elaborar novas estratégias de combate à LTA. O grupo tem avaliado as alterações das três subpopulações de monócitos na LCL (Pereira et al. manuscrito em preparação) e o grupo de pesquisadores pretendem avançar na imunofenotipagem destas subpopulações, tanto na LCL quanto na LM, expandindo também o conhecimento sobre a produção de citocinas por monócitos em resposta a diferentes agonistas de Toll Like Receptor [TLR] e antígenos de *L. (V.) braziliensis*, bem como sobre a capacidade dos monócitos CD16- ou CD16+ na indução dos diferentes perfis de linfócitos Th e na atividade microbicida dos macrófagos derivados destes monócitos contra *L. (V.) braziliensis*.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicita-se apresentar na Plataforma Brasil declaração assinada e datada pelo responsável do HC/UFG, instituição executora, participantes do projeto, demonstrando que a instituição proponente possui infraestrutura adequada para o desenvolvimento da pesquisa e condições de prestar assistência à saúde das participantes da pesquisa em caso de necessidade, sobretudo nas situações de urgência/emergência durante a execução do estudo. A declaração apresentada informa somente o manuseio dos prontuários.

Recomendações:

Recomendamos que o pesquisador deverá:

1. Atualizar o cronograma do projeto, pois o mesmo inicia as suas atividades no 1o. semestre de 2015. Na folha de rosto, o cronograma está diferente do projeto.
2. Retirar do projeto o documento em anexo I referente ao TCLE, pois o mesmo não condiz com o que foi anexado em documento isolado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVADO COM RECOMENDAÇÃO

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cephcufig@yahoo.com.br

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO**



Continuação do Parecer: 1.783.791

Considerações Finais a critério do CEP:

Pendente Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás-CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional CNS 001/13, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. Lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, através de Notificação via Plataforma Brasil, os relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações.

O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_445513.pdf	18/08/2016 17:48:39		Aceito
Outros	HCUFGComitedeetica.pdf	19/07/2016 18:40:34	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOLTA.pdf	28/03/2016 15:22:36	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	declaracaoorientador.pdf	14/03/2016 19:24:51	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_comiteUFG_controles_maio15.pdf	09/03/2016 20:01:35	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_comiteUFG_pacientes_maio15.pdf	09/03/2016 20:01:15	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	cartaodiretortecnicohc.pdf	09/03/2016 19:55:15	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	cartaencaminhamentoCEPHC.pdf	09/03/2016 19:48:45	VALERIA BERNADETE LEITE	Aceito

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
 Bairro: St. Leste Universitario CEP: 74.605-020
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cephcufg@yahoo.com.br

Página 10 de 12

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.783.791

Outros	cartaencaminhamentoCEPHC.pdf	09/03/2016 19:48:45	QUIXABEIRA	Aceito
Outros	cartadefinalidadedoestudoCEPHC.pdf	09/03/2016 19:47:59	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	ValeriaBernadete.pdf	04/11/2015 19:19:00	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	SebastiaoAlves.pdf	04/11/2015 19:18:42	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	NataliaAlberto.pdf	04/11/2015 19:18:22	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	MiriamLeandro.pdf	04/11/2015 19:17:33	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	MiltonPelli.pdf	04/11/2015 19:17:12	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	LucasLuzLima.pdf	04/11/2015 19:16:53	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	LediceInacia.pdf	04/11/2015 19:16:33	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	LarissaFonseca.pdf	04/11/2015 19:16:10	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	IsadoraCristinamendes.pdf	04/11/2015 19:15:52	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	HerminioSobrinho.pdf	04/11/2015 19:15:26	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	FatimaRibeiroDias.pdf	04/11/2015 19:14:42	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Outros	AnaCarolinaVieiradaCosta.pdf	04/11/2015 19:14:17	VALERIA BERNADETE LEITE QUIXABEIRA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	24/03/2015 18:40:15		Aceito
Outros	termocompromisso.jpg	19/03/2015 20:06:36		Aceito
Outros	termoresponsHDT.jpg	19/03/2015 20:05:54		Aceito

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitário

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cepcufig@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.783.791

Outros	termoresponsabilidadeiptsp.jpg	19/03/2015 20:05:24		Aceito
Outros	termoINGOH.jpg	19/03/2015 20:05:03		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR.pdf	19/03/2015 20:04:26		Aceito
Outros	atividades.jpg	19/03/2015 20:04:05		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 20 de Outubro de 2016

Assinado por:

JOSE MARIO COELHO MORAES
(Coordenador)

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020

UF: GO Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephufg@yahoo.com.br



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), de uma pesquisa. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62) 3269-8338 e 3269-8426 ou no endereço Hospital das Clínicas da UFG 1ª Avenida, s/n - Setor Leste Universitário, Goiânia - Goiás.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: **Avaliação das subpopulações de monócitos pro e antiinflamatórios na infecção causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Pesquisador Responsável:
Fátima Ribeiro Dias

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar):
Laboratório de Imunidade Natural/IPTSP: 062-3209 6116 – Dra. Fátima Ribeiro Dias: 62 3225 3751

Pesquisadores participantes: **Ana Carolina Vieira da Costa (Mestrado, Imunologia, IPTSP/UFG); Fátima Ribeiro Dias – Coordenadora, Pesquisadora Principal (Departamento de Imunologia/IPTSP/UFG); - Herminio Mauricio de R. Sobrinho (Doutorado, Imunologia, IPTSP/UFG); Isadora Cristina Mendes (graduanda em Biomedicina, UFG); Larissa Fonseca Gomides (graduanda em Biomedicina, UFG); Ledice I. A. Pereira - (Professor/Pesquisador, Médico do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP)/IPTSP/UFG; Hospital de Doenças Tropicais, Goiânia, Goiás); Lucas Luiz de Lima Silva (Mestrado, Imunologia, IPTSP/UFG); Milton A. P. Oliveira - Professor/Pesquisador (Departamento de Imunologia/IPTSP/UFG) Miriam Leandro Dorta – Professora/Pesquisadora (Departamento de Imunologia/IPTSP/UFG); Natália Alberto Alves Brandão - (Biomédica, Mestre em Epidemiologia, técnica, IPTSP/UFG); Sebastião A. Pinto (Professor/Pesquisador, Departamento de Patologia, Instituto Goiano de Hematologia e Oncologia-INGOH; Faculdade de Medicina/UFG); Valéria Bernadete Leite Quixabeira (Doutorado, Imunologia, IPTSP/UFG).**

Telefones para contato: em caso de qualquer intercorrência clínica ou reação adversas

Dra. Ledice I. Araújo Pereira ou Dra. Ana Joaquina C.S. Pereira. Telefones: 062-3249 3122 (HDT) e 3241 61173/ 3204 1917 (residência)

Descrição da pesquisa ([conforme Res. CNS n.º 196/96](#) – IV.1. a, b, c, d, e, f, g, h, i; citados no Protocolo de Pesquisa – CEP/UFG)

- Pesquisa com risco mínimo.

Neste estudo pretendemos entender melhor como as pessoas que têm leishmaniose se defendem da doença e identificar o agente que causa a doença. Uma das formas que podemos fazer isso é estudando as células e seus produtos que participam da resposta contra o parasito. Portanto, nós estaremos pesquisando no sangue dos voluntários saudáveis a presença de determinadas subpopulações das células sanguíneas, utilizando métodos já existentes, e como estas células respondem a antígenos dos parasitos. A sua colaboração nesse sentido, seria a doação de cerca de 20 mL de sangue obtida por punção venosa. Esclarecemos que esta quantidade será obtida seguindo a

Prédio da Reitoria - Térreo - Campus II - CEP-74001-970 - Goiânia-GO - Fones: 0 XX62 3521-1076 - Fax:3521-1163
Homepage: www.prppg.ufg.br - E_mail: prppg@prppg.ufg.br

colheita da bolsa de sangue, não sendo necessária uma nova punção. A punção sanguínea pode lhe causar um leve desconforto e dor pela picada da agulha, mas nenhum risco maior. O material será colhido uma única vez e será usado para pesquisar as células e proteínas. Os resultados obtidos poderão acrescentar informações importantes no conhecimento da doença, que poderá beneficiar no futuro todas as pessoas que estão expostas à leishmaniose. Você poderá pedir a retirada deste material do nosso estoque a qualquer momento e deixar de participar do estudo, além de pedir qualquer informação sobre os procedimentos, riscos e dúvidas relacionadas à pesquisa, utilizando os telefones para contato. Finalmente, gostaríamos de dizer que os resultados obtidos serão publicados em congressos e revistas especializadas, onde não terá nenhuma informação capaz de fazer a sua identificação como componente do grupo de pesquisa e esclarecer que não existe neste projeto um ressarcimento planejado aos pacientes/doadores, mesmo que os resultados obtidos e divulgados venham a receber premiações, já que não há nenhum ônus para o paciente para a execução da pesquisa, nem riscos diretos previstos oriundos da pesquisa.

Esclarecimentos sobre garantias do sujeito da pesquisa:

- ✓ É garantido o acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
- ✓ Os procedimentos de colheita de sangue serão efetuados com material descartável, sendo realizados por profissionais qualificados, não havendo riscos de infecções e garantindo-se o mínimo de desconforto (picada de agulha para colheita); ressaltando que tais procedimentos serão realizados independentes da pesquisa, por serem necessários à doação do sangue (colheita da bolsa).
- ✓ Você não receberá pagamento por sua participação nesse estudo.
- ✓ Você não precisará se deslocar para participar deste estudo, a colheita do sangue será realizada no centro onde você está sendo doador de sangue.
- ✓ Você tem direito de pleitear indenização em caso de dano à saúde decorrente da participação na pesquisa, porém os riscos de danos são mínimos.
- ✓ Liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo.
- ✓ É garantida a salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
- ✓ A sua colaboração na pesquisa resultará em benefícios para você, que estará colaborando com os pacientes com leishmaniose, e para os pacientes, uma vez que da pesquisa poderão resultar novas ideias para tratamento e acompanhamento do tratamento, bem como descobertas de fatores de prognóstico. Os benefícios de descobertas de tratamentos para a leishmaniose serão revertidos em benefício de toda a população exposta à doença.

✓ **Nome e Assinatura do pesquisador**

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,

RG/ CPF/ n.º de prontuário/ n.º de matrícula _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: () M () F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD()

abaixo assinado, concordo em participar do estudo **Explorando o papel da IL-32 na patogênese/control das infecções por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (V.) guyanensis***, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo

Prédio da Reitoria - Térreo - Campus II - CEP-74001-970 - Goiânia-GO - Fones: 0 XX62 3521-1076 - Fax:3521-1163
 Homepage: www.prppg.ufg.br - E_mail: prppg@prppg.ufg.br

pesquisador(a) _____ sobre
a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de
minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que
isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito: _____



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), de uma pesquisa. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Em caso de recusa, você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62) 3269-8338 e 3269-8426 ou no endereço Hospital das Clínicas da UFG 1ª Avenida, s/n - Setor Leste Universitário, Goiânia - Goiás.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: **Avaliação das subpopulações de monócitos pro e antiinflamatórios na infecção causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Pesquisador Responsável:
Fátima Ribeiro Dias

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar):

Laboratório de Imunidade Natural/IPTSP: 062-3209 6116 – Dra. Fátima Ribeiro Dias: 62 3225 3751

Pesquisadores participantes:

Ana Carolina Vieira da Costa (Mestrado, Imunologia, IPTSP/UFG); Fátima Ribeiro Dias – Coordenadora, Pesquisadora Principal (Departamento de Imunologia/IPTSP/UFG); - Herminio Mauricio de R. Sobrinho (Doutorado, Imunologia, IPTSP/UFG); Isadora Cristina Mendes (graduanda em Biomedicina, UFG); Larissa Fonseca Gomides (graduanda em Biomedicina, UFG); Ledice I. A. Pereira - (Professor/Pesquisador, Médico do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP)/IPTSP/UFG; Hospital de Doenças Tropicais, Goiânia, Goiás); Lucas Luiz de Lima Silva (Mestrado, Imunologia, IPTSP/UFG); Milton A. P. Oliveira - Professor/Pesquisador (Departamento de Imunologia/IPTSP/UFG) Miriam Leandro Dorta – Professora/Pesquisadora (Departamento de Imunologia/IPTSP/UFG); Natália Alberto Alves Brandão - (Biomédica, Mestre em Epidemiologia, técnica, IPTSP/UFG); Sebastião A. Pinto (Professor/Pesquisador, Departamento de Patologia, Instituto Goiano de Hematologia e Oncologia-INGOH; Faculdade de Medicina/UFG); Valéria Bernadete Leite Quixabeira (Doutorado, Imunologia, IPTSP/UFG).

Telefones para contato: em caso de qualquer intercorrência clínica ou reação adversas

Dra. Ledice I. Araújo Pereira ou Dra. Ana Joaquina C.S. Pereira. Telefones: 062-3249 3122 (HDT) e 3241 61173/ 3204 1917 (residência)

Descrição da pesquisa ([conforme Res. CNS n.º 196/96](#) – IV.1. a, b, c, d, e, f, g, h, i; citados no Protocolo de Pesquisa – CEP/UFG)

- Pesquisa com risco mínimo.

Neste estudo pretendemos entender melhor como as pessoas que têm leishmaniose se defendem da doença e identificar o agente que causa a doença. Uma das formas que podemos fazer isso é estudando as células e seus produtos que participam da resposta contra o parasito. Portanto, nós estaremos pesquisando no sangue dos voluntários a presença de determinadas subpopulações das células sanguíneas, utilizando métodos já existentes. Na biópsia (um pedaço da lesão) iremos isolar e identificar o agente causador da doença e as características da lesão e das células ao microscópio. **A**

sua colaboração nesse sentido seria a de permitir que o material que será coletado para exames de diagnóstico (sangue e biópsia) possam ser utilizados em pesquisas de células e proteínas (produtos químicos produzidos pelas células) relacionadas com a presença do agente causador da doença. A retirada do sangue e da biópsia são procedimentos necessários para que seja feito o diagnóstico de leishmaniose, entretanto, estamos pedindo a sua autorização para retirar o dobro de sangue daquele coletado para diagnóstico (10 mL ao invés de 5 mL) e reservar este material para pesquisar estas células e proteínas. A colheita do sangue será realizada após o diagnóstico e durante o acompanhamento do tratamento, até o final deste. Os parasitos obtidos serão estocados no Leishbank, o banco imunobiológico de leishmanioses, do Laboratório de Imunobiologia das leishmanioses, para futuros estudos dos parasitos. Os resultados obtidos poderão acrescentar informações importantes no conhecimento da doença, que poderá beneficiar no futuro todas as pessoas que estão expostas à leishmaniose. Em hipótese nenhuma você será penalizado no tratamento que é gratuito, caso não permita a execução da pesquisa com o seu material. Você poderá pedir a retirada deste material do nosso estoque a qualquer momento e deixar de participar do estudo, além de pedir qualquer informação sobre os procedimentos, riscos e dúvidas relacionadas à pesquisa, utilizando os telefones para contato. Finalmente, gostaríamos de dizer que os resultados obtidos serão publicados em congressos e revistas especializadas, onde não terá nenhuma informação capaz de fazer a sua identificação como componente do grupo de pesquisa e esclarecer que não existe neste projeto um ressarcimento planejado aos pacientes, mesmo que os resultados obtidos e divulgados venham a receber premiações, já que não há nenhum ônus para o paciente para a execução da pesquisa, nem riscos diretos previstos oriundos da pesquisa.

Esclarecimentos sobre garantias do sujeito da pesquisa:

- ✓ Todos os procedimentos e consultas deste estudo lhe serão fornecidos sem nenhum custo. Assistência médica não relacionada com este estudo será de sua responsabilidade. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
- ✓ Os procedimentos de colheita de sangue e biópsias serão efetuados com material descartável, sendo realizados por profissionais qualificados, não havendo riscos de infecções e garantindo-se o mínimo de desconforto (picada de agulha para colheita de sangue e anestesia para a biópsia); ressaltando que tais procedimentos serão realizados independentes da pesquisa, por serem necessários ao diagnóstico da doença.
- ✓ Você não receberá pagamento por sua participação nesse estudo.
- ✓ Caso você tenha algum dano relacionado direta ou indiretamente com a sua participação nesse estudo, você receberá suporte do médico responsável no centro onde você está sendo tratado.
- ✓ Você não precisará se deslocar para participar deste estudo, a coleta do material será realizada no centro onde você está sendo tratado.
- ✓ Você tem direito de pleitear indenização em caso de dano à saúde decorrente da participação na pesquisa, porém os riscos de danos são mínimos.
- ✓ Liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência, é garantida.
- ✓ É garantida a salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
- ✓ **A sua colaboração na pesquisa resultará em benefícios para você e outros pacientes com leishmaniose, uma vez que da pesquisa poderão resultar novas ideias para tratamento e acompanhamento do tratamento, bem como descobertas de fatores de prognóstico.**

Nome e Assinatura do pesquisador _____

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,

RG/ CPF/ n.º de prontuário/ n.º de matrícula _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: () M () F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:

.....

.....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD().....

abaixo assinado, concordo em participar do estudo **Explorando o papel da IL-32 na patogênese/control das infecções por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (V.) guyanensis***, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo pesquisador(a) _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data

Nome e Assinatura do sujeito: _____

ANEXO 2: FICHA DOS PACIENTES

DEPT DE MEDICINA TROPICAL E DERMATOLOGIA – IPTSP/UFG
HOSPITAL DE DOENÇAS TROPICAIS – SES/GO

FICHA PARA PACIENTES COM LEISHMANIOSE

1. N° REGISTRO: _____
2. N° PRONTUÁRIO: _____
3. DATA DE ATENDIMENTO: _____ / _____ / _____
4. NOME: _____
- ENDEREÇO PARA CONTATO E TELEFONE: _____

5. IDADE: _____ ANOS.
6. SEXO: MASCULINO (1) FEMININO (2)
7. LOCAL PROVÁVEL DO CONTÁGIO:
MUNICÍPIO: _____
8. ESTADO: _____
9. VIVE NO LOCAL DO PROVÁVEL CONTÁGIO: SIM () NÃO ()
10. CARACTERÍSTICAS DO LOCAL:
MATA (1) PRÓXIMO A RIO (2) ÁREA DE DESMATAMENTO (3) ESTRADA (4)
PERIFERIA DE CIDADE (5) FAZENDA (6) OUTROS (7) SEM INFORMAÇÃO (9)
11. ATIVIDADE EXERCIDA NO LOCAL DA INFECÇÃO:
MENOR (1) LAVRADOR (2) MOTORISTA (3) PEDREIRO (4) LAZER (5)
ASSENTAMENTO MST (6) TRATORISTA (7) DO LAR (8) OUTROS (9)
SEM INFORMAÇÃO (9)
12. FORMA DE LTA:
LC (1) LCM (2) LM (3) LCD (4) LCDS (5) SEM INFORMAÇÃO (6)
13. TEMPO DE APARECIMENTO DAS LESÕES: _____ MESES.
- BCG: SIM (1) NÃO (2) CICATRIZ: _____
14. TRATAMENTO ANTERIOR:
SIM (1) NÃO (2) SEM INFORMAÇÃO (9)
15. DROGA UTILIZADA ANTERIORMENTE:
GLUCANTIME-EQS. COPLETO (1) GLUCANTIME – ESQ. INCOMPETO (2)

ANFOTERICINA B (3) PENTAMIDINA (4) OUTRA DROGA (5) NENHUMA (6)
SEM INFORMAÇÃO (9)
ESQUEMA:

16. ÉPOCA DO TRATAMENTO ANTERIOR: _____ MESES. SEM INFORMAÇÃO (9)

:
17. EFEITOS COLATERAIS DA MEDICAÇÃO JÁ UTILIZADA:
NÃO (1) RASH (2) ARTRALGIAS (3) MIALGIAS (4) SEM INFORMAÇÃO (9)

18. APRESENTA CICATRIZ SUGESTIVA DE LTA ANTERIOR: SIM (1) NÃO (2)

19. Nº DE LESÕES CUTÂNEAS: _____

20. TIPOS DE LESÃO (ÕES) DE PELE:

ULCERADA: SIM (1) NÃO (2)
ULCERO – CROSTOSA: SIM (1) NÃO (2)
VERRUCOSA: SIM (1) NÃO (2)
NODULAR: SIM (1) NÃO (2)
ULCERO – VEGETANTE: SIM (1) NÃO (2)
OUTRO TIPO: SIM (1) NÃO (2) DESCREVER _____

21. TAMANHO DA(S) LESÃO(ÕES) _____

22. LOCAL DA(S) LESÃO(ÕES):

ORELHA: SIM (1) NÃO (2)
FACE: SIM (1) NÃO (2)
PESCOÇO: SIM (1) NÃO (2)
TRONCO: SIM (1) NÃO (2)
BRAÇO: SIM (1) NÃO (2)
ANTEBRAÇO: SIM (1) NÃO (2)
MÃO: SIM (1) NÃO (2)
COXA: SIM (1) NÃO (2)
PERNA: SIM (1) NÃO (2)
PÉ: SIM (1) NÃO (2)

23. ADENOMEGALIA SATÉLITE: SIM (1) NÃO (2)

24. LESÃO(ÕES) DE MUCOSA: SIM (1) NÃO (2)

25. LOCAL DA(S) LESÃO(ÕES) DE MUCOSA:

MUCOSA NASAL: SIM (1) NÃO (2)
GENGIVA: SIM (1) NÃO (2)
MUCOSA ORAL: SIM (1) NÃO (2)
PALATO: SIM (1) NÃO (2)
LÍNGUA: SIM (1) NÃO (2)

ÚVULA: SIM (1) NÃO (2)
AMÍGDALAS: SIM (1) NÃO (2)
FARINGE: SIM (1) NÃO (2)
LARINGE: SIM (1) NÃO (2)

26. TIPO DE LESÃO (ÕES) MUCOSAS:

ULCERADA: SIM (1) NÃO (2)
ERITEMATO-EDEMATOSA: SIM (1) NÃO (2)
INFILTRAÇÃO: SIM (1) NÃO (2)
PERFURAÇÃO DE SEPTO: SIM (1) NÃO (2)
OUTRO TIPO: SIM (1) NÃO (2) DESCREVER: _____

27. PATOLOGIAS ASSOCIADAS: SIM (1) NÃO (2)

28. DESCRIÇÃO DAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS: _____

29. HEMOGRAMA:

NORMAL (1) ALTERADO (2) NÃO REALIZADO (3) SEM INFORMAÇÃO (9)

HB: _____

HTO: _____

LEUC: _____

BAST: _____

SEG: _____

LINF: _____

EOS: _____

BAS: _____

MON: _____

PLASM: _____

PLAQ: _____

30. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS:

NORMAL (1) ALTERADO (2) NÃO REALIZADO (3) SEM INFORMAÇÃO (9)

PT: _____

ALB: _____

ALFA 1: _____

ALFA 2: _____

BETA: _____

GAMA: _____

31.UREIA () NÃO REALIZADO (00)
CREATININA () NÃO REALIZADO (00)
GLIC DE JEJUM () NÃO REALIZADO (00)
TGO () NÃO REALIZADO (00)
TGP () NÃO REALIZADO (00)

32.EXAME DEIRETO:
PRES DE AMASTIGOTA (1) AUS DE AMASTIGOTA (2) NÃO REALIZADO (3)

33.CARACTERIZAÇÃO DA LEISHMANIA:
L. brasiliensis (1) L. amazonensis (2) L. guyanensis (3) NÃO REALIZADO (4)

34. BIÓPSIA:
FRAGMENTO PARA HISTOPATOLÓGICO: SIM (1) NÃO (2)

35.DESCRICÃO HISTOPATÓLOGICA:
HIPERPLASIA PSEUDO EPITELIOMATOSA: SIM (1) NÃO (2)
ATROFIA: SIM (1) NÃO (2)
ULCERAÇÃO: SIM (1) NÃO (2)
INRF. INFL. MONONUCLEAR DIFUSO: SIM (1) NÃO (2)
GRANULOSAS: SIM (1) NÃO (2)
CELS. EPITELIÓIDES: SIM (1) NÃO (2)
PRESENÇA DE AMASTIGOTAS: SIM (1) NÃO (2)
NECROSE CASEOSA: SIM (1) NÃO (2)

36.RESULTADO HISTOPATOLOGICO:
LEISHMANIOSE CONFIRMADA (1)
COMPATÍVEL COM LEISHMANIOSE (2)
PROC. INF. CR. INESPECÍFICO (3)
ONDE FOI REALIZADO: _____

DATA: ____ / ____ / ____ N° EXAME: _____

37.TESTES INTRADÉRMICOS:
IR MONTENEGRO (_____ mm) NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO: (00)
PPD: (_____ mm)) NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO: (00)
IR PARACOCIDIODINA (_____ mm) NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO: (00)
IR CANDIDINA: (_____ mm) NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO: (00)

38. EXAMES SOROLÓGICOS:
RIFI: (_____) POSITIVO NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO: (00)

39. DIAGNÓSTICO:

CUTÂNEO (1) MUCOSA (2) CUTÂNEO – MUCOSA (3) DISSEMINADA (4)
DIFUSO ANÉRGICA (5)

40. TRATAMENTO ATUAL RECOMENDADO:

ANTIMONIAL PENTAVALENTE (1) ANFOTERICINA B (2)
PETAMIDINA (3) OUTRO (4)

41. DESCREVER: _____

42. TIPO DE ATENDIMENTO:

AMBULATÓRIO (1) INTERNAÇÃO (2) AMB+INT (3) AMB+LEITO-DIA (4)

43. EXAME CLÍNICO 30 DIAS PÓS-TRATAMENTO:

CURA CLÍNICA (1) MELHOR (2) INALT. (3) PIOR (4) NÃO RETORNOU (5)

44. TOMOU MEDICAÇÃO CORRETAMENTE? SIM (1) NÃO (2)

45. EFEITOS COLATERAIS DA MEDICAÇÃO: SIM (1) NÃO (2)

RASH: SIM (1) NÃO (2)

MIALGIAS: SIM (1) NÃO (2)

ARTRALGIAS: SIM (1) NÃO (2)

ANOREXIA: SIM (1) NÃO (2)

NÁUSEA: SIM (1) NÃO (2)

TONTEIRA: SIM (1) NÃO (2)

AUMENTO DE URÉIA: SIM (1) NÃO (2)

AUMENTO DE CREATININA: SIM (1) NÃO (2)

HIPOTASSEMIA: SIM (1) NÃO (2)

OUTROS: DESCREVER: _____

46. CONDUTA: _____

RETRATAMENTO: SIM (1) NÃO (2)

ESQUEMA UTILIZADO: _____

47. CONTROLE APÓS 3 MESES: SIM (1) NÃO (2)

DATA: ____ / ____ / ____

48. EXAME CLÍNICO 3 MESES PÓS TRATAMENTO:

CURA CLÍNICA (1) MELHOR (2) INALT. (3) PIOR (4) RECAÍDA (5)
NÃO RETORNOU (6)

49. RETRATAMENTO APÓS 3 MESES: SIM (1) NÃO (2)

50. TOMOU A MEDICAÇÃO CORRETAMENTE:
SIM (1) NÃO (2) SEM INFORMAÇÃO (3)

51. EFEITOS COLATERAIS DA MEDICAÇÃO: SIM (1) NÃO (2)
RASH: SIM (1) NÃO (2)
MIALGIAS: SIM (1) NÃO (2)
ARTRALGIAS: SIM (1) NÃO (2)
ANOREXIA: SIM (1) NÃO (2)
NÁUSEA: SIM (1) NÃO (2)
TONTURA: SIM (1) NÃO (2)
AUMENTO DE URÉIA: SIM (1) NÃO (2)
AUMENTO DE CREATININA: SIM (1) NÃO (2)
HIPOTASSEMIA: SIM (1) NÃO (2)
OUTROS: DESCREVER: _____

52. ESQUEMA UTILIZADO: _____
ANTIMONIAL PENTAVALENTE (1) ANFOTERICINA B (2) PENTAMIDINA (3)
OUTRO (4)
DESCREVER: _____
ESQUEMA: _____

53. RIFI 3 MESES: POS Tit (_____) NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO (00)

54. IR MONTENEGRO: POS (_____ mm) NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO (00)

55. CONTROLE APÓS 6 MESES: SIM (1) NÃO (2)
DATA: _____ / _____ / _____

56. EXAME CLÍNICO APÓS 6 MESES: SIM (1) NÃO (2)
CURA CLÍNICA (1) MELHOR (2) INALT.(3) PIOR (4) RECAÍDA (5)
NÃO RETORNOU (6)

57. RETRATAMENTO APÓS 6 MESES: SIM(1) NÃO (2)

58. TOMOU A MEDICAÇÃO CORRETAMENTE:
SIM (1) NÃO (2) SEM INFORMAÇÃO (3)

59. EFEITOS COLATERAIS DA MEDICAÇÃO: SIM (1) NÃO (2)
RASH: SIM (1) NÃO (2)
MIALGIAS: SIM (1) NÃO (2)
ARTRALGIAS: SIM (1) NÃO (2)
ANOREXIA: SIM (1) NÃO (2)
NÁUSEA: SIM (1) NÃO (2)

TONTEIRA: SIM (1) NÃO (2)
AUMENTO DE URÉIA: SIM (1) NÃO (2)
AUMENTO DE CREATININA: SIM (1) NÃO (2)
HIPOTASSEMIA: SIM (1) NÃO (2)
OUTROS: DESCREVER: _____

60. ESQUEMA UTILIZADO: _____

ANTIMONIAL PENTAVALENTE (1) ANFOTERICINA B (2) PENTAMIDINA (3)
OUTRO (4)
DESCREVER: _____

ESQUEMA: _____

61. RIFI 6 MESES: POS Tif (_____) NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO (00)

62. IR MONTENEGRO: POS (_____ mm) NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO (00)

63. CONTROLE APÓS 12 MESES: SIM (1) NÃO (2)
DATA: _____ / _____ / _____

64. EXAME CLÍNICO APÓS 12 MESES:
CURA CLÍNICA (1) MELHOR (2) INALT.(3) PIOR (4) RECAÍDA (5)
NÃO RETORNOU (6)

65. RETRATAMENTO APÓS 12 MESES: SIM (1) NÃO (2)
DATA: _____ / _____ / _____

66. TOMOU A MEDICAÇÃO CORRETAMENTE:
SIM (1) NÃO (2) SEM INFORMAÇÃO (3)

67. EFEITOS COLATERAIS DA MEDICAÇÃO: SIM (1) NÃO (2)
RASH: SIM (1) NÃO (2)
MIALGIAS: SIM (1) NÃO (2)
ARTRALGIAS: SIM (1) NÃO (2)
ANOREXIA: SIM (1) NÃO (2)
NÁUSEA: SIM (1) NÃO (2)
TONTEIRA: SIM (1) NÃO (2)
AUMENTO DE URÉIA: SIM (1) NÃO (2)
AUMENTO DE CREATININA: SIM (1) NÃO (2)
HIPOTASSEMIA: SIM (1) NÃO (2)
OUTROS: SIM (1) NÃO (2) DESCREVER: _____

68.ESQUEMA UTILIZADO: _____

ANTIMONIAL PENTAVALENTE (1) ANFOTERICINA B (2) PENTAMIDINA (3)
OUTRO (4)

DESCREVER: _____

ESQUEMA: _____

69.RIFI 12 MESES: POS Tif (_____) NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO (00)

70. . IR MONTENEGRO: POS (_____ mm) NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO (00)

71. CONTROLE APÓS 18 MESES: SIM (1) NÃO (2)

DATA: _____ / _____ / _____

72. CONTROLE APÓS 18 MESES PÓS TRAT:

CURA CLÍNICA (1) MELHOR (2) INALT.(3) PIOR (4) RECAÍDA (5)

NÃO RETORNOU (6)

73. RETRATAMENTO APÓS 18 MESES: SIM (1) NÃO (2)

74. TOMOU A MEDICAÇÃO CORRETAMENTE: SIM (1) NÃO (3) SEM INF. (3)

75. RASH: SIM (1) NÃO (2)

MIALGIAS: SIM (1) NÃO (2)

ARTRALGIAS: SIM (1) NÃO (2)

ANOREXIA: SIM (1) NÃO (2)

NÁUSEA: SIM (1) NÃO (2)

TONTEIRA: SIM (1) NÃO (2)

AUMENTO DE URÉIA: SIM (1) NÃO (2)

AUMENTO DE CREATININA: SIM (1) NÃO (2)

HIPOTASSEMIA: SIM (1) NÃO (2)

OUTROS: SIM (1) NÃO (2) DESCREVER: _____

76. 68.ESQUEMA UTILIZADO: _____

ANTIMONIAL PENTAVALENTE (1) ANFOTERICINA B (2) PENTAMIDINA (3)
OUTRO (4)

DESCREVER: _____

ESQUEMA: _____

77. RIFI 18 MESES: POS Tif (_____) NEGATIVO (0) NÃO REALIZADO (00)

78. IR MONTENEGRO: POS (mm) NEG (0) NÃO REALIZADO (00)
OUTRAS INFORMAÇÕES:

