

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

Hélio Galdino Júnior

**Avaliação da participação de citocinas (interleucina 32,
interleucina 10, fator de necrose tumoral) e receptores
similares a *Toll* (TLR 4) na infecção por *Leishmania*
(*Viannia*) sp.**

**Goiânia
2013**

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: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

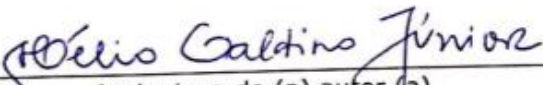
Nome completo do autor: Hélio Galdino Júnior

Título do trabalho: Avaliação da participação de citocinas (interleucina 32, interleucina 10, fator de necrose tumoral) e receptores similares a Toll (TLR 4) na infecção por *Leishmania (Viannia) sp.*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ 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.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 15 / 08 / 2016

HÉLIO GALDINO JÚNIOR

Avaliação da participação de citocinas (interleucina 32, interleucina 10, fator de necrose tumoral) e receptores similares a *Toll* (TLR 4) na infecção por *Leishmania* (*Viannia*) sp.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Dra. Fátima Ribeiro Dias

**Goiânia
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Galdino Júnior, Hélio.
G149a Avaliação da participação de citocinas (interleucina 32, interleucina 10, fator de necrose tumoral) e receptores similares a *Toll* (TLR 4) na infecção por *Leishmania* (*Viannia*) sp. [manuscrito] / Hélio Galdino Júnior. - 2013.
107 f. : figs., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Ribeiro Dias.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2013.
Bibliografia.
Inclui listas de tabelas, figuras, siglas e abreviaturas.
Anexos.

1. Leishmaniose tegumentar americana - Imunopatologia.
2. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. I. Título.

CDU: 616.993.161

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Hélio Galdino Júnior

Orientador (a): Prof. Dra. Fátima Ribeiro Dias

Membros:

1. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

2. Dra. Marina Tiemi shio

3. Dra. Mara Rubia Marques

4. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

5. Dra. Fátima Ribeiro Dias

Data: 26/07/2013

Á minha família pelo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Acredito que toda realização envolve pessoas que nos inspiram, ou seja, são nossas referências, aquelas que nos motivam, nos dando oportunidade e apoio, e que nos momentos difíceis, nos diz, você é capaz, também fazem parte deste processo aquelas pessoas que nos auxiliam na tarefa, dividindo o trabalho e aquelas que tornam o trabalho possível viabilizando as condições necessárias para a realização do mesmo.

Desta forma, agradeço meus pais, pela oportunidade de estudar, aos meus professores da graduação por me inspirar e por ser uma referência para mim. A minha orientadora, que me concedeu a oportunidade de percorrer uma trajetória começando na monitoria, seguida pela iniciação científica, mestrado e chegando até aqui, na conclusão do doutorado, foram 12 anos de muito aprendizado.

Agradeço aos colegas do laboratório pela companhia, e pela troca de experiências, como foram muitos anos, muitas pessoas passaram pelo laboratório, Assim, não vou citar nomes para não esquecer nenhum, mas preciso agradecer em especial a Lívia Lara Pessoni, Eduarda Maldaner e Stefanne Madalena, que me auxiliaram na execução dos experimentos. Ao Professor Frederico Soriane e Clayson Moura pelo auxílio nas reações de PCR em Belo Horizonte.

Agradeço a Dra. Ledice Inácio e aos pacientes do ambulatório de leishmaniose do Hospital de Doenças Tropicais e aos doadores e funcionários do banco de sangue do Ingoh e do Hospital das Clínicas UFG.

Aos professores Milton Adriano Pelle e Miriam Leandro Dorta pelo apoio e sugestões. A professora Aline Carvalho Batista pelo auxílio na técnica de Imunohistoquímica e pela contribuição na qualificação. Assim como aos professores Rui Lino e Leda Quércia pela disponibilidade de avaliar este trabalho na qualificação. A Fapeg pela bolsa de formação.

SUMÁRIO

1. Tabela e figuras.....	xiii
2. Siglas e abreviaturas.....	ix
3. Resumo.....	x
4. Abstract.....	xii
5. Introdução.....	1
6. Justificativa.....	14
7. Objetivos.....	16
8. Artigo 1.....	17
9. Artigo 2.....	53
10. Discussão.....	80
11. Conclusões.....	92
12. Referências.....	93
13. Anexos.....	103

TABELA E FIGURAS

Artigo 1:

Table 1. Characteristics of ATL patients

Figure 1. IL-32 is detected in cutaneous and mucosal lesions of ATL patients.

Figure 2. Expression of IL-32 was detected in several cells.

Figure 3. Similar levels of IL-32 γ mRNA in lesions of patients with cutaneous (CL) and mucosal (ML) leishmaniasis.

Figure 4. Expression of TNF and IL-10 was increased in cutaneous and mucosal lesions of ATL patients.

Figure 5. Increase of TNF mRNA but not IL-10 mRNA in lesions of patients with mucosal leishmaniasis.

Figure 6. *L. (V.) braziliensis* induces IL-32 γ mRNA in human mononuclear cells.

Artigo 2:

Figura 1. Formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* induzem a produção de TNF e IL-10 em células mononucleares pré-tratadas com IFN γ .

Figura 2. Avaliação da participação do TLR4 na produção de TNF e IL-10 induzida por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3 em células mononucleares humanas.

Figura 3 - Agonista de TLR4 aumenta a produção de TNF induzida por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3 em células mononucleares humanas pré-tratadas com IFN γ .

Figura 4 - O LPS não altera a produção de IL-10 induzida por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* em células mononucleares humanas.

Figura 5. Formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* diminuem a expressão de TLR4 na membrana citoplasmática de monócitos/macrófagos humanos.

SIGLAS E ABREVIATURAS

- COX2: Cicloxigenase tipo 2
- GIPL: Glicoinositolfosfolipideos
- GM-CSF: do inglês Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
- IFN γ : Interferon gamma
- IL: do inglês Interleukin
- LC: Leishmaniose cutânea
- LCL: Leishmaniose cutânea localizada
- LM: Leishmaniose mucosa
- LPG: Lipofosfoglicano
- LPS: Lipopolissacarideo
- LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
- MDP: muramildipeptídeo
- NLR: do inglês NOD-like receptors
- NO: do inglês Nitric Oxide
- NOD: do inglês *nucleotide oligomerization domain*
- PAMP: do inglês *pathogen-associated molecular patterns*
- PCR: do inglês Polymerase Chain Reaction
- PGE2: prostaglandina E₂
- PMN: Polimorfonucleares
- TLR: do inglês *toll-like receptors*
- TNF: do inglês Tumor Necrosis Factor

RESUMO

A leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, causada, no Brasil, principalmente pela espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Na imunopatogenia da LTA participam várias citocinas e receptores. A interleucina 32 (IL-32) é uma citocina pro-inflamatória, cuja participação na LTA ainda não foi investigada. O papel dos receptores similares a *Toll* (TLR) na LTA tem sido pouco investigado, especialmente considerando infecção por *L. (V.) braziliensis*. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da IL-32, do TNF e da IL-10 nas lesões de pacientes com LTA, a indução de IL-32 por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* em células mononucleares (CMN) humanas, bem como avaliar a participação do TLR4 na infecção de monócitos/macrófagos humanos com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Fragmentos de lesões cutâneas ou mucosas de pacientes com LTA e tecidos sadios foram obtidos, sendo usados para a determinação do subgênero de *Leishmania*, usando a PCR-RFLP; para análise de IL-32, TNF e IL-10 por imunistoquímica; e para análise da expressão das isoformas α , β , γ , δ da IL-32, do TNF e da IL-10, por qRT-PCR. As CMN foram cultivadas com amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, na ausência ou presença de IFN γ e a indução de IL-32 foi avaliada por qRT-PCR e TNF e IL-10, por ELISA. Para neutralização de TLR4 foram usados anticorpos monoclonais e lipopolissacarídeo (LPS), como agonista de TLR4. A expressão de TLR4 nos monócitos/macrófagos presentes nas CMN foi avaliada por citometria de fluxo. Foram analisados 35 pacientes sendo 23 leishmaniose cutânea (LC) e 12 com leishmaniose mucosa (LM). Todas as amostras PCR positivas continham parasitos pertencentes ao subgênero *Viannia*. Nas lesões de pacientes com LC e LM foi detectada uma maior expressão tanto da proteína quanto do mRNA da IL-32 do que nos tecidos controles, porém níveis similares foram encontrados nas duas formas clínicas. Somente a isoforma IL-32 γ foi detectada. As proteínas TNF e a IL-10 foram detectadas nas lesões, em níveis similares na LC e na LM, porém, o mRNA do TNF estava em níveis mais elevados nas lesões de LM (4.069 vezes) do que nas lesões de LC (141 vezes, $p < 0,05$). As formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* indiziram a produção de IL-32 γ , TNF e de IL-10 nas CMN

pré-tratadas com IFN γ . A produção de TNF e IL-10 foi dependente de TLR4 e o tratamento das CMN com LPS aumentou a produção do TNF induzido pelas amastigotas ($p < 0,05$), mas não alterou a produção da IL-10. A incubação com IFN γ aumentou significativamente a porcentagem de monócitos/macrófagos TLR4⁺ ($p < 0,05$), a qual foi diminuída pelas formas amastigotas ($p = 0,06$). Os resultados mostram que a IL-32 γ é produzida durante a infecção humana causada por *L. (Viannia)* e evidenciam a participação de TLR4 na indução de TNF e IL-10 em CMN humanas por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Ainda, os dados sugerem que as formas amastigotas causam a internalização dos TLR4, o que pode ser um mecanismo de evasão da resposta imune. Portanto, a IL-32 e o TLR4 parecem importantes componentes na infecção humana causada por *L. (Viannia)*, especialmente *L. (V.) braziliensis*, podendo contribuir para a imunopatogenia ou para o controle da infecção.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a disease caused by protozoa *Leishmania*. In Brazil, the most prevalent species is *L. (Viannia) braziliensis*. Several cytokines and receptors are involved in immunopathogenesis of ATL, however, the role of interleukin 32 (IL-32) was not investigated in this disease. Besides, toll-like receptors (TLR) were poorly evaluated in *Leishmania* infection, especially when it is caused by *L. (V.) braziliensis*. The aim of the present study was to evaluate IL-32, TNF and IL-10 expression in ATL lesions; the induction of IL-32 by *L. (V.) braziliensis* amastigotes in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultures as well as the involvement of TLR4 in monocyte/macrophage response to *L. (V.) braziliensis* amastigotes. Biopsies fragments from cutaneous and mucosal lesion and healthy tissues were used to investigate the subgenus of the parasites by PCR-RFLP assay; expression of IL-32, TNF and IL-10 was assayed by immunohistochemistry and expression of IL-32 isoforms α , β , γ , δ , TNF and IL-10 was analysed by qRT-PCR. The PBMC were cultured with *L. (V.) braziliensis* amastigotes in the absence or presence of IFN γ and IL-32 induction was assayed by qRT-PCR; and TNF and IL-10, by ELISA. TLR4 was neutralized by monoclonal antibodies and lipopolysaccharide (LPS) was used as TLR4 agonist. The expression of TLR4 in monocyte/macrophages was evaluated by flow cytometry. Thirty five patients were evaluated, 23 with cutaneous leishmaniasis (CL) and 12 with mucosal leishmaniasis (ML). All parasite positive samples contained *L. (Viannia)* sp. The expression of IL-32 (protein and mRNA) was similar in CL and ML lesions but was higher than in health tissues. Only IL-32 γ was detected. The proteins TNF and IL-10 were detected in similar levels in CL and ML lesions, but TNF mRNA was present in higher levels in ML (4.069x) than in CL lesions (141x, $p < 0.05$). *L. (V.) braziliensis* amastigotes induced IL-32 γ , TNF and IL-10 in IFN γ pre-treated PBMC. The production of TNF and IL-10 was TLR4 dependent and treatment of PBMC with LPS further increased the production of TNF induced by amastigotes ($p < 0.05$). However, LPS did not alter the IL-10 production. Treatment with IFN γ enhanced the percentage of TLR4⁺ monocyte/macrophage ($p < 0.05$), which was decreased

following incubation with amastigotes ($p = 0.06$). The results showed that IL-32 γ is produced during *L. (Viannia)* infection and TLR4 mediates *L. (V.) braziliensis* amastigote-induced TNF and IL-10 production in human PBMC. Moreover, the data suggest that amastigotes can lead to TLR4 internalization what can allow parasite to evade of innate immune response. This study indicates that IL-32 and TLR4 are important players in human infection caused by *L. (Viannia)*, especially *L. (V.) braziliensis*. Whether TLR4 is also important to IL-32 production by human monocytes/macrophages deserves further investigation.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

A LTA é uma doença infecto-parasitária, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete a pele e/ou as mucosas oral e da nasofaringe. No Brasil, a LTA é considerada uma doença negligenciada e um problema de saúde pública (Gontijo & Carvalho, 2003). Avelar et al. (2012) estimam que a incidência da LTA no mundo pode chegar a 1,2 milhões de novos casos por ano.

A infecção é causada pela inoculação das formas promastigotas metacíclicas na pele, durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomia*. No organismo do hospedeiro vertebrado, estas formas são fagocitadas por células tais como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas e se diferenciam em formas amastigotas, capazes de sobreviver e se multiplicarem no interior dessas células, especialmente nos macrófagos, até o rompimento das mesmas e a disseminação para células vizinhas (Ashford 2000; Almeida et al. 2003). O estabelecimento da infecção depende da interação entre o parasito, o vetor e a resposta imune do hospedeiro.

No Brasil, as três principais espécies são *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Dependendo da região, pode-se encontrar uma prevalência maior de determinada espécie, como por exemplo, na região amazônica a espécie prevalente causando lesão cutânea é *L. (V.) guyanensis*, seguida por *L. (V.) braziliensis*. No entanto, nesta região do país têm sido encontradas infecções mistas (Camara Coelho et al. 2011). Carvalho et al. (2006), em um estudo feito no município de Cuiabá, no Mato Grosso, identificaram que 91,1% dos casos de LTA são causados por *L. (V.) braziliensis*. Resultado similar foi encontrado por Oliveira et al. (2010), em que mostraram a prevalência de *L. (V.) braziliensis* no Estado de Goiás. Em Minas Gerais, em um total de 66 amostras de casos confirmados, 61 foram identificados como *L. (V.) braziliensis*, enquanto apenas cinco foram identificados como *L. (L.) amazonensis* (Volpini et al. 2004). Em Parati, no Rio de Janeiro, *L. (V.) braziliensis* também foi o agente infeccioso de 81,8% dos casos de LTA descritos por Vieira-Gonçalves et al. (2008). Tanto na região Sul como na região Norte encontra-se uma prevalência dessa

espécie, como evidenciado pelos estudos de Silveira et al. (1999) e Bacha et al. (2011), respectivamente. Assim, a espécie *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais prevalente no Brasil.

O indivíduo infectado com *L. (V.) braziliensis* pode apresentar desde uma infecção subclínica, ou seja, sem sinais e sintomas da infecção, porém, apresentando resposta imune específica, como mostrado pelo teste de hipersensibilidade a antígeno de leishmânia (Folador et al. 2002), até lesões cutâneas localizadas e ulceradas, disseminadas ou mucocutâneas (Ashford 2000; Gontijo & Carvalho 2003; Antinori et al. 2012). Há também descrição de lesões atípicas em pacientes com LTA (Guimarães et al. 2009).

Na leishmaniose cutânea localizada (LCL) humana, decorrente de infecção por *L. (V.) braziliensis*, a lesão surge no local da inoculação do parasito, com aspecto de pápula hiperemiada que evolui de tamanho, apresentando-se de aspecto nodular, podendo ulcerar, gerando lesão de características peculiares, com bordas elevadas e fundo raso (Silveira et al. 2009). O número de lesões pode variar de acordo com o número de inoculações do parasito, ou da capacidade de disseminação deste no organismo do hospedeiro, como mostrado por Vieira-Gonçalves et al. (2008). Na LCL, o infiltrado celular inflamatório é moderado, os parasitos são escassos nos macrófagos, sendo mais frequente a presença de granuloma do tipo epitelióide, caracterizado pela presença de macrófagos ativados e dispostos em formação semelhante ao tecido epitelial, células gigantes, linfócitos e plasmócitos (Silveira et al. 2004). A predominância de citocinas de linfócitos T auxiliares do tipo 1, Th1 (Interferon gama, IFN γ ; fator de necrose tumoral, TNF) sobre Th2 (interleucina 4, IL-4) parece ser o perfil mais comumente encontrado na LCL (Silveira et al. 2004). A análise de lesões de pacientes com LCL, causadas por *L. (V.) braziliensis*, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) mostrou que IL-1 α , TNF e IFN γ estavam aumentadas nas lesões.

A importância das células Th1 e dos seus produtos na cura da LCL foi mostrada no estudo de Kemp et al. (1999). Utilizando citometria de fluxo, os autores mostraram que células mononucleares de pacientes que obtiveram cura espontânea responderam a antígeno de *L. major*, produzindo altos níveis de IFN γ e TNF e baixos de IL-10, sendo que a fonte celular destas citocinas foram predominantemente linfócitos T CD4⁺. Bottrel et al. (2001) mostraram que o antígeno solúvel de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi mais potente na indução de proliferação das células mononucleares e na

produção de citocinas do que uma proteína denominada LACK (do inglês, Leishmaniahomolog of receptors for activated C-kinase) derivada da *L. major*. O mesmo estudo mostrou que a principal fonte de IFN γ foram linfócitos T CD4⁺ e a produção de TNF foi proveniente de linfócitos e monócitos.

Os fatores que determinam o resultado da infecção, ou seja, se o indivíduo apresentará a forma subclínica ou o desenvolvimento da doença em suas diversas formas e gravidade, ainda não estão bem estabelecidos. Novoa et al. (2011) avaliaram a resposta das células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com infecção subclínica e com LCL a antígeno solúvel de *L.(V.) braziliensis* e mostraram que as células dos pacientes com LCL produziram níveis mais elevados de TNF e IFN γ do que as dos indivíduos com infecção subclínica. Não foi observada diferença significativa quanto aos níveis de IL-10, mostrando que a fraca resposta imune nos indivíduos com infecção subclínica não foi devido aos efeitos reguladores da IL-10, sugerindo que o controle da LTA no grupo subclínico pode ter sido mediado pela imunidade natural.

Na forma mais grave, causada por *L. (V.) braziliensis*, a leishmaniose mucosa (LM), ocorre meses ou anos após a lesão cutânea primária. Estima-se que 3 a 5% dos indivíduos portadores de lesões cutâneas irão desenvolver a forma mucosa (Marsden 1986). A maioria dos pacientes portadores desta forma clínica possui cicatriz de lesão cutânea, sugerindo infecção prévia com persistência e disseminação dos parasitos (Weigle et al. 2006). A propagação ocorre provavelmente por via hematogênica. O sintoma mais comum é a congestão nasal, resultante do eritema, edema e ulceração das narinas, odinofagia e disfagia também estão presentes em pacientes com lesões mucosas. A perfuração de septo nasal, epistaxe, rinorréia, lesões no palato e destruição progressiva da orofaringe são sinais frequentes na LM, podendo causar desfigurações (Ashford 2000; Gontijo & Carvalho 2003; Amato et al. 2009). A observação sistemática da evolução das lesões na mucosa, levou Lessa et al. (2012) a proporem um sistema de estágios de evolução das lesões mucosas, sendo o estágio I caracterizado por nodulação sem ulceração, o II, por ulceração superficial, o III, por ulceração profunda, o IV, por perfuração do septo nasal e o estágio V, por destruição da arquitetura nasal e alterações na face.

As lesões da LM apresentam um abundante infiltrado inflamatório histioplasmocitário e linfocitário, com macrófagos contendo escassos parasitos, sendo que em alguns pacientes há formação de granuloma epitelióide. Os pacientes apresentam forte resposta imune celular (presença de linfócitos Th1), concomitante com uma

progressiva destruição tecidual. Após o contato dos parasitos com os macrófagos, ocorre a produção de TNF, que é uma citocina pró-inflamatória, produzida tanto por células da imunidade natural quanto da imunidade adquirida, apresentando um papel central na defesa contra patógenos intracelulares. Devido às atividades exercidas na lesão causada por *Leishmania* spp, o TNF tanto pode ajudar na eliminação dos parasitos, auxiliando no controle da infecção, quanto pode exacerbar a lesão tecidual causada pela infecção, dificultando a cura das lesões. (Cáceres-Dittmar et al., 1993; Pirmez et al., 1993; Amato et al., 2003; Silveira et al., 2004).

Bacellar et al. (2002) mostraram que células mononucleares de pacientes com LM respondem a antígeno de *L.(L.) amazonensis*, produzindo maiores concentrações de IFN γ e TNF do que as de pacientes com LC, e que após o tratamento, a concentração de TNF foi reduzida em 60%, evidenciando um papel para essa citocina na imunopatologia da LM. A resposta imune é necessária para a proteção do hospedeiro contra uma variedade de microrganismos potencialmente patogênicos, tais como a leishmânia, no entanto, um mecanismo paralelo de controle da resposta imune exuberante é requerido para limitar os danos teciduais no hospedeiro. A IL-10 é uma citocina antiinflamatória com um papel crucial em prevenir doenças inflamatórias e autoimunes e pode ser secretada por várias células da imunidade natural e adaptativa (Saraiva & O'Garra 2010). A IL-10 também é expressa por células de linhagem não linfóide, como os queratinócitos (Gasim et al. 1998). O papel da IL-10 na LTA tem sido estudado, principalmente avaliando-se a capacidade das células mononucleares em produzir esta citocina, após estimulação com antígenos de leishmânia. Souza et al. (2012) mostraram que as células de pacientes com LCL ativa e de indivíduos sadios produzem IL-10 em concentrações similares quando expostas a antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. A adição de IL-10 em culturas de células de pacientes com LTA estimuladas com antígeno de *L. (L.) amazonensis* foi mais eficaz para modular a produção de IFN γ nas células de pacientes com LC do que dos pacientes com LM, sugerindo que pacientes com LM podem ter um prejuízo na capacidade de responder a IL-10 (Bacellar et al. 2002). Faria et al. (2005) sugerem um papel para IL-10 no controle da resposta inflamatória em lesões mucosas. Bourreau et al. (2001) mostraram que pacientes com LCL resistentes ao tratamento, apresentavam uma alta expressão de IL-10 nas suas lesões, implicando essa citocina no favorecimento da infecção. Resultado similar foi visto na leishmaniose visceral (forma de leishmaniose que atinge as células do sistema fagocítico-mononuclear das vísceras como baço e fígado,

bem como da medula óssea). Os autores mostraram que, em culturas de células aspiradas do baço de pacientes, a utilização de anticorpos neutralizantes de IL-10 resultou na redução da população de células infectadas (Gautan et al. 2011). Portanto, a presença de IL-10 pode comprometer a resposta imune ao parasito, mas é necessária para o controle do processo inflamatório, diminuindo a lesão tecidual.

Diante desses estudos, o papel do TNF e da IL-10 na LTA, formas cutânea e mucosa, tem sido esclarecido, mas ainda faltam elementos para entender os mecanismos de controle e de imunopatologia destas formas clínicas. Recentemente uma nova citocina denominada IL-32 tem sido implicada em doenças inflamatórias crônicas, tais como artrite reumatóide e doenças inflamatórias intestinais, bem como em doenças infecciosas causadas por vírus e bactérias (Joosten et al. 2006; Shioya et al. 2007; Xu et al. 2012; Bai et al. 2011). O envolvimento da IL-32 em doenças parasitárias, tais como a LTA, não foi investigado até o momento.

1.2. IL-32: possível envolvimento na LTA

Inicialmente descrita como o transcrito NK4 de células NK humanas ativadas por IL-2, as propriedades biológicas da citocina IL-32 foram descritas por Kim et al. (2005). Seis isoformas foram identificadas para a IL-32 humana (α , β , γ , δ , ϵ e ζ), sendo a isoforma IL-32 γ a que corresponde ao transcrito NK4 e ainda não foi encontrado o gene homólogo da IL-32 humana em camundongos. Células epiteliais produzem IL-32, após estimulação com IL-18, IL-1 β e IFN γ (IL-32 α e β). A IL-32 é também produzida por células NK, após estimulação com IL-12/IL-18, e por células mononucleares do sangue periférico humano ativadas por mitógeno (Kim et al. 2005). Kim et al. (2005) demonstraram, ainda, que a IL-32 recombinante (α e β) induz a produção de TNF e IL-8 em linhagem de monócitos humanos (THP-1). Meyer et al. (2010) mostraram que queratinócitos humanos produzem IL-32, a qual parece ser importante na imunopatologia da dermatite atópica. Em outra doença alérgica, a rinite, Jeong et al. (2011) mostraram que a IL-32 é produzida pela mucosa nasal dos pacientes e sua expressão está associada a produção de citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-18 e fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, *granulocyte and macrophage-colony stimulating factor*). Coletivamente, estes dados apontam a IL-32 como uma potente citocina pro-inflamatória.

Durante a ativação da imunidade inata, o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) pelos receptores celulares, associados à membrana celular ou intracelulares, tais como os receptores similares à *Toll* (TLR, *toll-like receptors*), ou NLR (NOD-like receptors; NOD: *nucleotide oligomerization domain*), induz a produção de citocinas pro-inflamatórias, as quais devem propiciar um ambiente adequado para a eliminação dos patógenos, a indução da imunidade adquirida e o reparo tecidual. A IL-32 induz citocinas pro-inflamatórias em monócitos, especialmente agindo sinergicamente com agonistas dos receptores intracelulares NOD1 e NOD2, como o muramildipeptídeo (MDP), agonista de NOD2, oriundo de peptidoglicana de bactérias Gram negativas ou positivas (Netea et al., 2005). A IL-32, juntamente com o MDP, aumenta a produção de IL-1 β e IL-6 via um mecanismo dependente de caspase-1. No aumento de TNF e IL-6, induzidos por diferentes agonistas de TLR, ou no de TNF induzido via NOD, a IL-32 apresentou apenas um efeito aditivo. Tais resultados levaram à pesquisa do envolvimento da IL-32 na patogênese da doença de Crohn, uma doença inflamatória intestinal na qual os pacientes apresentam uma mutação em NOD2, bem como na de outras doenças inflamatórias da mucosa intestinal. Shioya et al. (2007) mostraram um aumento da expressão de IL-32 α no epitélio da mucosa do cólon de pacientes com doença inflamatória intestinal, colite ulcerativa e doença de Crohn. Além disto, os autores mostraram que em linhagens de células epiteliais intestinais a expressão de IL-32 foi aumentada por exposição a IL-1 β , IFN γ ou TNF, sendo que o IFN γ e o TNF sinergizam para aumentar a indução de IL-32. Portanto, parece haver uma alça de retroalimentação positiva na produção de IL-32 e citocinas pro-inflamatórias, especialmente a IL-1 β e o TNF. Citocinas pro-inflamatórias atuam sobre o epitélio induzindo IL-32 e esta, por sua vez, induz mais produção destas citocinas, podendo gerar um processo inflamatório crônico que causa lesão tecidual.

Outra doença inflamatória crônica, onde o TNF é importante, é a artrite reumatóide, cuja expressão de IL-32 foi demonstrada no tecido sinovial ou em culturas de sinoviócitos dos pacientes (Cagnard et al. 2005; Joosten et al. 2006; Shoda et al. 2006). Joosten et al. (2006) encontraram uma correlação positiva entre a atividade da doença, bem como a expressão de IL-1 β , TNF e IL-18, e a expressão de IL-32 na sinóvia de pacientes com artrite reumatóide. Além disto, a injeção de IL-32 intra-articularmente no joelho de camundongos causou edema, influxo celular e lesão da cartilagem. Tanto o

edema como o influxo celular foram dependentes da produção de TNF. Em um modelo de camundongos expressando a IL-32 humana pós transfecção gênica, Shoda et al. (2006) mostraram que há um aumento nos níveis séricos de TNF e culturas de células esplênicas estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) produzem maiores quantidades de TNF, IL-1 β e IL-6 do que as células de animais controles. Os camundongos com excesso de IL-32 ou animais controles, para os quais foram transferidos linfócitos T CD4⁺ dos animais expressando excessivamente IL-32, apresentam exacerbação de artrite e colite, de maneira dependente de TNF. Juntos, estes estudos apontam a IL-32 como um importante componente da patogênese de doenças inflamatórias crônicas relacionadas ao TNF, sugerindo que a IL-32 pode ser um novo alvo terapêutico nestas doenças.

Considerando que a IL-32 pode também desempenhar um importante papel na defesa contra infecções, Netea et al. (2006) avaliaram a indução de IL-32 por micobactérias. *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis* BCG induziram elevada produção de IL-32 (α e γ) em monócitos humanos, de maneira dependente de IFN γ . A indução de IFN γ é dependente de IL-18. Assim, as micobactérias induzem IL-18 e, subsequentemente, IFN γ e este induz IL-32. Os autores ainda mostraram que outros patógenos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* não induzem IL-32. Bai et al. (2011) mostraram que a expressão da IL-32 estava aumentada nos pacientes com doença pulmonar causada por micobactérias do complexo *M. avium* comparada com aquela de tecido pulmonar de indivíduos saudáveis. Os autores mostraram que a IL-32 γ pode contribuir para o controle do crescimento das micobactérias. Recentemente, foi demonstrado que na infecção por *M. leprae* a expressão de IL-32 nas lesões está associada à forma clínica, sendo que nas lesões tuberculóides (perfil Th1) há elevada expressão de IL-32, mas nas lesões lepromatosas (perfil Th2) há baixa expressão de IL-32. A ativação de monócitos via NOD2 induz IL-32 que medeia a diferenciação de monócitos em células dendríticas com elevada capacidade de ativar linfócitos T citotóxicos, contribuindo para a defesa contra a infecção (Schenk et al. 2012).

Alguns estudos descreveram um aumento dos níveis séricos de IL-32 em infecção por vírus, tais como por vírus da imunodeficiência humana (HIV, *human immunodeficiency virus*) e vírus influenza A. O HIV aumenta a produção de IL-32 e esta, por sua vez, inibe a replicação do vírus, sugerindo um mecanismo de defesa contra o

vírus (Rasool et al. 2008). Li et al. (2008), além de mostrarem o aumento da IL-32 no soro dos pacientes infectados com vírus influenza A, também mostraram que células epiteliais infectadas pelo vírus produzem prostaglandina E₂ (PGE₂), a qual é responsável pelo aumento da produção de IL-32 nas células infectadas. A IL-32 produzida controla a produção de PGE₂, diminuindo a expressão de cicloxigenase tipo 2 (COX-2), a enzima responsável pela produção de prostaglandinas. Ao contrário do que ocorreu nas células epiteliais, em monócitos humanos e macrófagos murinos, a IL-32 é um potente indutor de PGE₂, o que deve contribuir para aumentar as respostas inflamatórias (Joosten et al. 2006). Bae et al. (2011) mostraram que o soro de pacientes com H1N1 possuía maiores concentrações de IL-32 do que o soro de controles saudáveis. Os mesmos autores mostraram que a IL-32 γ induz transferrina que possui atividade antiviral. Outros estudos evidenciam a participação da IL-32 na resposta inflamatória induzida pela infecção com vírus da hepatite B e da hepatite C (Xu et al. 2012; Moschen et al. 2011).

Os dados publicados sobre a IL-32 mostram que esta citocina pode ser relevante tanto na imunidade inata quanto na adquirida contra infecções, especialmente naquelas infecções onde o sítio da infecção pode sofrer influência do tecido epitelial, como é o caso da LTA, tanto na forma cutânea como na forma mucosa. No início da infecção por *Leishmania*, após o reconhecimento de PAMPs pelos receptores celulares, tais como TLR (Becker et al. 2003; Kropf et al. 2004; Liese et al. 2008), citocinas pro-inflamatórias como a IL-1 β e TNF, produzidos por macrófagos residentes, bem como o IFN γ produzido por células NK que infiltram a lesão (Scharton & Scott, 1993), podem induzir as células epiteliais a produzirem IL-32. Esta citocina, por sua vez, pode contribuir para a diferenciação de monócitos em macrófagos (Netea et al. 2008) ou células dendríticas (Schenk et al. 2012) e para a produção de mais moléculas pro-inflamatórias. A produção de IL-32 em níveis controlados poderia contribuir com moléculas tais como o IFN γ e o TNF para a atividade microbicida dos macrófagos e a eliminação dos parasitos ou poderia amplificar respostas inflamatórias inadequadamente controladas causando lesão tecidual.

1.3 TLR na leishmaniose

O sistema imune inato possui uma família de receptores que reconhecem PAMPs dos diversos microrganismos e sinalizam a presença dos mesmos. Entre estes receptores,

os TLR representam importantes moléculas para a identificação de bactérias, vírus, fungos e protozoários (Medzhitov et al. 1997; Albiger et al. 2007). Os TLR são estruturalmente caracterizados pela presença de um domínio rico em leucina em sua porção extracelular, compondo o sítio de ligação ao PAMP. Cada TLR é capaz de reconhecer determinados padrões presentes nos microorganismos, assim, TLR3 reconhece RNA de fita dupla, um PAMP viral. Também reconhecem PAMPs virais, os TLR7 e TLR8 (para RNA de fita simples). Já os TLR5, TLR4 e TLR9 reconhecem PAMPs bacterianos, como a flagelina, o LPS e motivos de CpG DNA não metilados, respectivamente. O TLR2 é o TLR com maior número de ligantes identificados até o momento, sendo capaz de reconhecer PAMPs de bactérias Gram negativas, Gram positivas, micoplasmas, protozoários e fungos (Takeda et al. 2003; Albiger et al. 2007). Essa capacidade de reconhecer vários produtos microbianos é devido à propriedade de formar heterodímeros com os receptores TLR1 ou TLR6. Assim, lipoproteínas tri-aciladas, como, por exemplo, o Pam₃Cys, são reconhecidas pelo heterodímero TLR2/TLR1, enquanto lipopeptídeos di-acilados, são reconhecidos pelo heterodímero TLR2/TLR6 (Oliveira-Nascimento et al. 2012). O TLR11, em camundongos, reconhece bactérias uropatogênicas (Zhang et al. 2004) e também a profilina, uma proteína de *Toxoplasma gondii*. Assim, TLR5 e TLR11 ligam proteínas. Ainda em camundongos, foram descritos os TLR12 e TLR13, cujos ligantes ainda não foram identificados (Albiger et al. 2007).

Os TLR são expressos em várias células do sistema imune inato, tais como, monócitos, macrófagos, células dendríticas em diferentes estágios de maturação e subtipos, mastócitos e células polimorfonucleares (PMN). E, além dessas, as células epiteliais das mucosas também expressam os TLR. Os TLR podem estar presentes na membrana das células e/ou nos compartimentos citosólicos. Em geral, os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são expressos nas membranas citoplasmáticas celulares, enquanto os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos intracelularmente, nas membranas dos endossomos (Takeda et al. 2003). Os TLR são expressos constitutivamente em várias células, mas a expressão destes receptores pode ser modulada por vários produtos microbianos ou citocinas. O LPS induz aumento de TLR2 em macrófagos e neutrófilos, tanto após injeção *in vivo*, quanto após tratamento *in vitro* destas células, sem alterar ou diminuir a expressão de TLR4 (Kurt-Jones et al. 2002). Citocinas tais como os fatores de crescimento de macrófagos e de neutrófilos (M-CSF, *macrophage- colony stimulating factor*, e GM-CSF e), IL-15 e IFN γ , IL-1 β e TNF aumentam a expressão de TLR2 em

monócitos/macrófagos e neutrófilos. O IFN γ e o M-CSF aumentam também a expressão de TLR4 em TLR3 em monócitos, porém o IFN γ diminui a expressão de TLR5 nestas células. A expressão de TLR4 em neutrófilos é aumentada pelo tratamento com GM-CSF (Mita et al. 2001; Kurt-Jones et al. 2002; Takeda et al. 2003, O'Mahony et al. 2008). Assim, as citocinas que aumentam a atividade microbida dos fagócitos, além de ativarem as células via seus receptores específicos, também amplificam as respostas microbicidas e inflamatórias por meio do aumento da expressão dos TLR.

Após o reconhecimento do PAMP pelo TLR, a transdução de sinais se faz por meio de um domínio intracelular denominado TIR (Toll/Interleukin-1 receptor), que leva à ativação dos fatores de transcrição NF κ B e AP-1 e à produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas acessórias. A via de sinalização dos TLR inclui, inicialmente, a fosforilação do TLR dependente de proteína tirosina quinase (Chen et al. 2003), seguida do recrutamento de proteínas adaptadoras, a MyD88 (*Myeloid differentiation protein 88*), presente na via de sinalização de todos os TLR, exceto o TLR3, e a Mal/TIRAP (Mal, *MyD88 adaptor-like* ou TIRAP, *TIR domain-containing adaptor protein*), presente na via de sinalização de TLR4 e TLR2 (Fitzgerald et al. 2001; Mansell et al. 2004; Kawai & Akira 2007). Em seguida, a MyD88 ativa as quinases IRAK1 e IRAK4 (*IL-1R-associated kinases*). A hiperfosforilação destas quinases leva à associação de TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), ocasionando a ativação de quinases do complexo I κ B, de c-jun NH2-terminal quinase (JNK), p38 e ERK1/2 (todas MAPKs, *Mitogen-activated protein kinases*). Conseqüentemente, ocorre a ativação dos fatores de transcrição NF κ B e de AP-1, levando à secreção de citocinas e quimiocinas, tais como a IL-1, TNF, IL-12 e IL-8, além da expressão de COX-2 e produção de prostaglandinas e de óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) (Scherle et al. 1998; Hume et al. 2001; Jones et al. 2001; Khan et al. 2004). A via da Mal/TIRAP ativa IRAK-2 e interage diretamente com o TRAF6, para gerar a ativação de MAPK e de NF κ B (Fitzgerald et al. 2001; Mansell et al. 2004).

Uma via alternativa à via da MyD88 foi definida, na qual é utilizada a proteína adaptadora TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN β), que ativa o fator de transcrição regulador do interferon, o IRF-3, para gerar produção de interferons do tipo I. Esta via é associada ao TLR3 e ao TLR4, sendo o TLR3 o único TLR com via de sinalização totalmente independente de MyD88. Para recrutar a proteína TRIF, o TLR4 necessita de outra proteína adaptadora que é a TRAM (*TRIF-related adapter molecule*), a

qual não é necessária para a via TLR3. Assim, a TRAM é uma molécula específica da via de ativação do TLR4, independente de MyD88 (Kawai & Akira 2007).

O envolvimento dos TLR na infecção por leishmânia tem sido estudado e uma das primeiras evidências da participação destes receptores na infecção vieram dos estudos de Veer et al. (2003). Estes autores revelaram que camundongos deficientes na molécula adaptadora MyD88 foram mais suscetíveis à infecção por *L. major* e demonstraram que o TLR2 estava envolvido na resposta imune inata, sendo um glicofosfolípídeo (lipofosfoglicano, LPG) de membrana, presente na membrana do parasito, o ligante para o TLR2. Outro estudo buscou esclarecer o papel deste receptor na infecção com *L. major*. Becker et al. (2003) mostraram que o LPG de *L. major* induz um aumento da expressão de TLR2 em células NK (*Natural Killer*), bem como a produção das citocinas INF γ e TNF, e que esta indução é mediada pela ligação do LPG ao TLR2, implicando esse receptor no combate à infecção. Kropf et al. (2004) mostraram que o TLR4 contribui para o controle da infecção com *L. major*, sendo que o mecanismo de controle do crescimento do parasito foi por meio da indução da iNOS e produção de NO. Em camundongos deficientes de TLR4, a atividade da arginase-1 estava aumentada, contribuindo para o crescimento do parasito.

A participação de TLR9 no controle da infecção pela *L. major* foi mostrada por Liese et al. (2007), utilizando camundongos deficientes em TLR9 os autores mostraram que na ausência deste receptor os animais exibiram lesões mais severas e foi encontrada uma maior carga parasitária do que nos animais controles. Houve uma menor indução de INF γ pelas células NK e, conseqüentemente, uma atividade citotóxica deficiente, mostrando assim que o TLR9 é essencial para a ativação de células NK na infecção por *L. major*. Confirmando os estudos de Liese et al. (2007), Abou Facker et al. (2009) mostraram que o DNA de *L. major* ativa células dendríticas via TLR9. Essa ativação é fundamental para o desenvolvimento de uma resposta Th1, uma vez que a sinalização via TLR9 propiciou a maturação das células dendríticas, aumentando a expressão de moléculas co-estimuladoras e a produção de IL-12, as quais são necessárias para o favorecimento de um perfil Th1 e a resistência à infecção. Os camundongos deficientes em TLR9 infectados com formas promastigotas de *L. major* desenvolveram lesões significativamente maiores e mais duradouras do que os animais controles. A carga parasitária, após 21 dias de infecção, estava significativamente mais elevada nos camundongos deficientes em TLR9, mostrando que esses animais tem um prejuízo no

controle do crescimento dos parasitos, o qual está associado a uma baixa frequência de linfócitos T produtores de IFN γ e uma maior produção de IL-4.

Considerando a espécie causadora de leishmaniose visceral, *L. donovani*, Flandin et al. (2006) mostraram o envolvimento de TLR3 na internalização de formas promastigotas, bem como na produção de NO e TNF para controlar a infecção. Mukherjee et al. (2012) mostraram um importante papel para TLR4 e TLR9 no controle da infecção por *L. donovani*. Os autores observaram que o miltefosine, um fármaco utilizado para o tratamento da leishmaniose, induziu citocinas Th1 e reduziu a produção de IL-10 e TGF β (*transforming growth factor*), promovendo o controle da infecção em monócitos THP1 infectados com *L. donovani*. O fármaco também induziu um aumento na expressão de TLR4 e TLR9, sendo que a indução de imunidade protetora foi dependente da ação destes receptores.

Em relação às espécies que causam leishmaniose nas Américas, Gallego et al. (2011) mostraram a participação do TLR4 na infecção. Neste estudo, macrófagos derivados de células U937 foram infectados por *L. (V.) panamensis*, sendo observado que após a infecção, observou-se um aumento na expressão dos TLR1, TLR2, TLR3 e TLR4. O mesmo estudo sugere que a produção de TNF induzida pela *L. (V.) panamensis* foi mediada pelo TLR4, uma vez que nas células deficientes neste receptor a produção desta citocina foi abolida. Além da indução de TNF, o TLR4 apresentou um importante papel na atividade leishmanicida dos macrófagos.

Além de uma avaliação do TLR4, outros trabalhos avaliaram a importância de outros TLR na infecção por leishmânias causadoras da LTA. Guerra et al. (2010) apontam que o TLR2 pode favorecer a infecção por *L. (L.) amazonensis*, onde os camundongos deficientes em TLR2 apresentam uma carga parasitária menor do que os controles, sugerindo que a ausência deste receptor nos estágios iniciais da infecção favorece o controle da mesma. Recentemente, Tuon et al. (2012) mostraram que, nas lesões de pacientes com LCL causada por *L. (V.) braziliensis*, a expressão de TLR2 estava aumentada em relação àquela de indivíduos saudáveis, bem como, era maior do que a expressão de TLR4 nos pacientes, sugerindo que o TLR2 pode ter maior importância na LCL, porém não foi encontrada correlação entre a expressão deste receptor e a quantidade de citocinas, controle ou gravidade da doença.

Macrófagos derivados da medula óssea foram ativados por motivos de CpG não metilados de DNA de *L. (V.) mexicana*, o que causou a produção de TNF e IL-12p40 via ativação de TLR9 (Martinez-Salazar et al. 2008). A participação de TLR9 na LTA

também foi avaliada por Tuon et al. (2010), que mostraram a expressão de TLR9 nas lesões de pacientes com LC e observaram a expressão desse receptor em macrófagos presentes em granulomas na derme, sugerindo que a expressão de TLR9 pode ser importante para a formação do granuloma e para o controle do parasito.

Recentemente, Ives et al. (2011) sugeriram o envolvimento de TLR3 na gravidade de lesões mucosas de pacientes com LTA, uma vez que revelaram que uma cepa de *L. (V.) guyanensis*, capaz de induzir metástase, possuía material genético viral, sendo assim, capaz de ativar TLR3 e induzir a produção de citocinas próinflamatórias e quimiocinas. A ativação via TLR3 pelo vírus RNA parece ser importante para o desenvolvimento da lesão mucosa.

Os estudos da participação dos TLR na infecção por leishmania tem levado a novas perspectivas para o desenvolvimento de vacinas e tratamento imunoterapêutico, como foi demonstrado por Calvopina et al. (2006), em que a administração de um agonista de TLR4 (ONO-4007), juntamente com antígeno de membrana de *L. (L.) amazonensis*, foi capaz de reduzir o tamanho das lesões nas patas de camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis*. Essa associação de agonista de TLR4 mais antígenos dos parasitos induziu uma maior produção de IFN γ e de IL-12 nas células dos linfonodos dos camundongos. A combinação de agonistas de TLR têm se mostrado eficaz no estudo de imunoterapia, como mostrado por Raman et al. (2010). Neste estudo, os autores infectaram camundongos com *L. major* e, em seguida, trataram os animais com uma combinação de agonistas de TLR4 e de TLR9, juntamente com uma vacina denominada de L110f, e encontraram que o tratamento reduziu significativamente o tamanho das patas e a carga parasitária. O tratamento com cada agonista isolado, junto com a vacina, não foi diferente dos animais que receberam solução salina. Somente a combinação dos dois agonistas junto com a vacina levou ao desenvolvimento de uma forte resposta Th1. Daifalla et al. (2011) avaliaram o uso de agonistas de TLR4 e TLR9 como adjuvantes na imunização de camundongos BALB/c com proteínas de *L. donovani* e encontraram que o uso destes agonistas, junto com a imunização, aumentou a produção de IgG2a e a produção de IFN γ , direcionando para uma resposta Th1, evidenciando que o acionamento desses receptores no momento da imunização aumenta a eficácia das vacinas.

2 JUSTIFICATIVA

A LTA é um problema de saúde pública no Brasil e em outros países do mundo. É uma doença, cuja forma clínica depende da interação parasito-vetor-hospedeiro, podendo resultar em formas clínicas que variam de lesões únicas na pele até lesões mucosas desfigurantes, e, apesar dos grandes avanços científicos na compreensão da imunologia da LTA, várias questões sobre a patogenia desta doença, tais como o que determina o desenvolvimento da forma mucosa, ainda precisam ser esclarecidas.

No Brasil, o principal agente causal da LTA é *Leishmania (V.) braziliensis*, sendo, portanto, fundamental o estudo das lesões, bem como da resposta imune desencadeada por esse patógeno. A IL-32 é uma citocina pró-inflamatória envolvida em processos autoimunes e infecciosos, na maioria deles, relacionada à gravidade das doenças. Os estudos apontam que em algumas infecções, a IL-32 pode ser induzida e ser a responsável pela exacerbação da resposta inflamatória e da consequente lesão tecidual, ou pode ser importante para a eliminação de agentes infecciosos. Assim, nós criamos a hipótese de que a IL-32 poderia estar envolvida na LTA, principalmente na forma mucosa, contribuindo para o processo inflamatório e a destruição tecidual.

Os TLR são receptores presentes em células imunes e não imunes, que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos. O estudo dos TLR na infecção por diferentes espécies de leishmânia tem contribuído para a compreensão da resposta imune; no entanto, poucos estudos avaliaram a interação dos TLR com formas amastigotas, e não há estudos sobre a interação de TLR com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Avaliar se as formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* utilizam TLR4 pode ajudar a compreender o estabelecimento da resposta imune induzida pelo parasito, bem como a modular a resposta induzida. Alguns estudos tem mostrado que agonistas de TLR podem ser utilizados na imunoterapia e em estratégias de imunização, em associação com antígenos de *Leishmania*, porém não foi ainda avaliada a interação de agonista de TLR4 com a infecção por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Apesar de alguns avanços na compreensão do papel dos TLR na leishmaniose, tem sido observado que a ativação e a função desses receptores podem ser diferentes para cada

espécie de *Leishmania*, ou até mesmo para cada fase do ciclo de vida do parasito, se promastigota ou se amastigota.

Mais estudos a respeito do papel dos TLR na infecção por *L. (V.) braziliensis*, no estágio amastigota, pode aumentar a compreensão da importância desses receptores na infecção, na produção das citocinas TNF, IL-10 e possivelmente a IL-32, contribuindo assim para a elaboração de novas abordagens terapêuticas para a LTA.

3 OBJETIVOS

Geral:

- Avaliar a expressão das citocinas IL-32, IL-10 e TNF nas lesões de pacientes com LTA formas cutânea e mucosa causada por *L. (Viannia) sp*, bem como, avaliar o envolvimento de TLR4 na indução de citocinas em culturas de células mononucleares humanas com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

Específicos:

Do artigo 1:

- Avaliar a expressão do TNF, da IL-10 e das isoformas α , β , γ e δ da IL-32, nas lesões de pacientes com as formas cutânea ou mucosa, antes de iniciar o tratamento, bem como em tecidos de controles sadios.

- Avaliar se formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* são capazes de induzir IL-32 em células mononucleares do sangue periférico de doadores sadios.

Do artigo 2:

1- Avaliar a capacidade das formas amastigota de *L. (V.) braziliensis* para a indução de TNF e IL-10 em células mononucleares humanas.

2- Avaliar o envolvimento do TLR4 na produção de TNF e IL-10 induzido pela amastigota de *L. (V.) braziliensis*

3- Avaliar o papel do LPS (agonistas de TLR4) na produção de citocinas (TNF e IL-10) por células mononucleares humanas incubadas com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

4- Avaliar se formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* modulam a expressão dos TLR4 durante a infecção experimental de monócitos/macrófagos humanos.

4 ARTIGOS

Artigo 1 – Interleukin 32 γ is highly expressed in cutaneous and mucosal American Tegumentary Leishmaniasis

Autores: Hélio Galdino Jr, Anetícia Eduarda Maldaner, Livia Lara Pessoni, Frederico M. Soriani, Ledice Inácia de Araújo Pereira, Sebastião Alves Pinto, Fernanda Bugalho Duarte, Clayson Moura Gomes, Anna Karoline Aguiar Fleuri, Miriam Leandro Dorta, Milton Adriano Pelli de Oliveira, Mauro Martins Teixeira, Aline Carvalho Batista, Leo A. B. Joosten, Leda Quercia Vieira, Fátima Ribeiro-Dias

Revista: BMC Infectious Diseases

Publicado em: 9 de Maio de 2014

Link para o artigo:

<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-14-249>

Interleukin 32 γ is highly expressed in cutaneous and mucosal American Tegumentary Leishmaniasis

Hélio Galdino Jr,¹ Anetícia Eduarda Maldaner,¹ Livia Lara Pessoni,¹ Frederico M. Soriani,² Ledice Inácia de Araújo Pereira,¹ Sebastião Alves Pinto,³ Fernanda Bugalho Duarte,⁴ Clayson Moura Gomes,¹ Anna Karoline Aguiar Fleuri,¹ Miriam Leandro Dorta,¹ Milton Adriano Pelli de Oliveira,¹ Mauro Martins Teixeira,² Aline Carvalho Batista,⁵ Leo A. B. Joosten,⁶ Leda Quercia Vieira,² Fátima Ribeiro-Dias^{1*}

¹ Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

² Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³ Department of Pathology, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Goiás, and Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH), Goiânia, Goiás, Brazil.

⁴ Otorhinolaryngology, Hospital Unique, Goiânia, Goiás, Brazil

⁵ Department of Pathology, Faculty of Odontology, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

⁶ Department of Medicine, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

*Correspondence to: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N – Setor Universitário, 74605-050, Goiânia, Goiás, Brazil. Phone: +55 62 3209 6116, Fax: +55 62 3209 6363. E-mail address: fatimardias@gmail.com, fdias@iptsp.ufg.br

Short running title: IL-32 γ in American Tegumentary Leishmaniasis

No conflicts of interest were declared.

Abstract

Background: The interleukin 32 (IL-32) is a proinflammatory cytokine produced by immune and non-immune cells. It can be induced during bacterial and viral infections but its production was not investigated in protozoan infections. American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is caused by *Leishmania* protozoan leading to cutaneous, nasal or oral mucosa lesions. The aim of this study was to evaluate the expression of IL-32 in cutaneous and mucosal lesions as well as in peripheral blood mononuclear cells exposed to *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Methods: The IL-32, tumour necrosis factor (TNF) and IL-10 expression as proteins was evaluated by immunohistochemistry in cutaneous and mucosal lesions, and healthy tissues. The isoforms of IL-32 α , β , δ , γ mRNA, TNF mRNA and IL-10 mRNA were assessed by qRT-PCR in fragments of lesions and healthy tissues, and also in peripheral blood mononuclear cells from healthy donors cultured with amastigotes of *L. (V.) braziliensis*. In lesions, parasite subgenus was identified by PCR-RFLP.

Results: We showed that total IL-32 as well as IL-32 γ is similarly up-regulated in lesions of cutaneous (CL) or mucosal (ML) leishmaniasis patients. The cytokine was produced by epithelial, endothelial, mononuclear cells and giant cells. Expression of TNF was higher in ML than in CL lesions, however levels of IL-10 were similar in both clinical forms. There was no association between levels of IL-32 and those of TNF or IL-10 in CL or ML lesions. In all lesions in which the parasite was detected, *L. (Viannia)* subgenus was identified. In addition, *L. (V.) braziliensis* could induce IL-32 γ in peripheral blood mononuclear cells from healthy blood donors.

Conclusion: Together, these data suggest that IL-32 can play a role in inflammatory process or in control of *L. (Viannia)* sp infection.

Key words: IL-32; Leishmaniasis; TNF; IL-10; *Leishmania (Viannia)* sp

Background

The interleukin 32 (IL-32) was initially described as natural killer (NK) cell transcript 4 (NK4) expressed in human activated NK and T cells [1]. After the description of several inflammatory cytokine properties of the NK4 this was named IL-32 [2]. The four isoforms of IL-32 produced by mRNA alternative splicing (α , β , γ , δ) that were expressed in immune and nonimmune cells was firstly described. Soon after, another two isoforms (ϵ , ζ) were described which are highly expressed in activated T lymphocytes [2,3]. The isoform IL-32 γ presents the highest biological activity [4]. Sequence homology between IL-32 and other cytokines was not found, and it was not identified a homologous gene in mouse [2]. Most of IL-32 is cell-associated, however depending on the cell type and stimulus it can be released [2,5,6,7]. In inflammatory and infectious diseases as well as in healthy tissue, epithelial cells express IL-32 [7,8,9]. Primary keratinocytes produces IL-32 after activation with interferon gamma (IFN γ) and tumour necrosis factor (TNF) [7]. The cytokines TNF, IFN γ , and IL-1 β induces IL-32 in intestinal epithelial cell lines [10]. Immune cells, such as NK cells stimulated with IL-12/IL-18, and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultured with mitogens also express IL-32 [2]. Monocytes/macrophages and dendritic cells express IL-32 upon toll-like receptor (TLR) activation [5,11].

During inflammation IL-32 can be induced by inflammatory cytokines, and, in turn, this cytokine also induces other inflammatory mediators. It has been demonstrated that recombinant IL-32 (α and β) induces TNF and IL-8 in human monocyte lineage THP-1 and murine macrophage lineage RAW 264.7, as well as CXCL2 chemokine in murine macrophages. The induction of cytokines by IL-32 involves activation of transcription factor NF κ B and p38 mitogen-activated protein

kinase [2]. The IL-32 induces inflammatory mediators (TNF, IL-6, prostaglandin E₂) as well as anti-inflammatory cytokine (IL-10) in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells [11,12]. The IL-32 γ synergizes with nucleotide oligomerization domain 1 and 2 (NOD1/NOD2) ligands and with TLR2 agonist to induce IL-1 β [9,13]. Such effects has pointed out IL-32 as an important player in the pathogenesis of inflammatory diseases as atopic dermatitis, Crohn's disease, rheumatoid arthritis and rhinitis [7,10,12,14]. Especially a cross-talk between IL-32 and TNF has been described to be relevant in the pathogenesis of these diseases [15,16,17]. During infection caused by influenza A virus [18], human immunodeficiency virus [19] and *Mycobacterium avium* [8] an increase of IL-32 production has been reported. *Mycobacterium tuberculosis* can induce IL-32 in human monocytes in a caspase-1/IL-18/IFN γ -dependent manner [5]. Microbicidal mechanisms can be induced by IL-32 during these infections [18,20]. Together, these data indicate that microorganisms can induce IL-32 expression in immune and nonimmune cells to control the infection, but alternatively this cytokine might play a role in the pathogenesis of the diseases.

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a chronic inflammatory disease caused by *Leishmania* parasites. In Brazil, the species that belong to *Viannia* complex can induce different clinical manifestations of the disease. The localized cutaneous leishmaniasis (CL) is most frequent and patients can present spontaneous clinical cure. However, mucosal leishmaniasis (ML) which affects nasopharyngeal and oral mucosal (with ulceration and septum perforation) never heals spontaneously, it is difficult to treat, and recurrence is frequent [21,22]. A cellular immune response (Th1 lymphocytes) is crucial to control the infection, but it is also deleterious to tissues leading to ulcerated lesions. The

Montenegro's skin test (delayed hypersensitivity) reveals the strong Th1 response in ATL patients [23]. Typical Th1 cytokines, IFN γ and TNF, are detected in lesions and these cytokines promote macrophage activation to control the parasite [24] but they also promote inflammation and tissue destruction [23,25,26]. Besides inflammatory cytokines, IL-10 is also detected in ATL lesions [25,26]. A balance between TNF/IFN γ and IL-10 seems to be important to control the infection and inflammatory process [27,28]. Because these cytokines are related to the production and biological actions of IL-32, the presence of this cytokine was not evaluated in leishmaniasis, and in ATL could exist an interaction between epithelium and inflammatory cells, we hypothesized that IL-32 can be induced during *Leishmania* infection and to contribute to the pathogenesis of the disease. As it has been demonstrated that IL-32 γ can be spliced to IL-32 β that is less inflammatory, suggesting a balance between IL-32 γ /IL-32 β to control inflammation [17] we also evaluated which isoforms of IL-32 could be produced during ATL.

Material and Methods

Patients, controls, and tissue samples

In Anuar Auad Tropical Disease Hospital, in Goiânia, Goiás, West Central region of Brazil, patients were diagnosed with cutaneous (n = 23) or mucosal (n = 12) ATL when at least one of the exams were positive (Montenegro's skin test, histopathological analysis or indirect immunofluorescence). Biopsy specimens were obtained from cutaneous or nasal/oropharynx lesions of ATL patients and from healthy tissues during plastic surgery (for cutaneous tissue, n = 8) or tonsil or nasal septum surgeries (for mucosal tissues, n = 7). One fragment of biopsy

was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin for histological and immunohistochemical analysis; another one was stored in Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for gene expression evaluation, and the last one was stored in saline (-20°C) for molecular characterization of parasites. From another set of healthy donors (n = 21), a blood sample was collected (5 ml) for PBMC isolation. All procedures were approved by Ethics Committee in Research of Universidade Federal de Goiás (165/08) and informed consent was signed by all patients and controls.

Molecular characterization of *Leishmania*

The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to identify *Leishmania* subgenus in biopsy fragments. Briefly, tissue lysates were obtained from frozen biopsy fragments by adding 25 µl of TE (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), and proteinase K (100 µg/ml), at 56 °C, for 3 h. The DNA was extracted using the *illustra™blood genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) as recommended by the manufacturer. The PCR was carried out using 1 µM of each primer (to conserved region of minicircles of kDNA), 150: 5- GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3- and 152: 5- (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T) TTACACCAACCCC 3- [29], together with 200 µM of dNTPs, including dUTP instead of dTTP, 0.8 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen), buffer (10 mM Tris–HCl pH 8.6, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) and 1 µl of DNA template, in a final volume of 10 µl. Amplification was carried out in Eppendorf PTC-100 machine, using an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 29 cycles at 94 °C for 1 min, 59 °C for 45 s, 72 °C for 30 s and a final extension step of 7 min. The PCR products were run in

an 8% polyacrylamide gel in a Mini-Protean II apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), followed by silver staining to visualize the bands. Positive controls containing DNA of *L. (V.) braziliensis* or *L. (L.) amazonensis* and a negative control without DNA were included in each reaction set. All positive samples were subjected to RFLP analysis of the amplification product [30]. The PCR products (5 µL) were used for digestion by the addition of 1 U of *Hae III* (Invitrogen) for 3 h, at 37 °C. The restriction fragments were separated in a 10% polyacrylamide gel in the Mini-Protean II apparatus (Bio-Rad) and silver stained. The *Hae III* digested the 120 bp PCR product of *L. (V.) braziliensis* producing two fragments, one of 40 bp and other of 80 bp and the enzyme did not digest *L. (L.) amazonensis* amplicon.

Immunohistochemical (IHC) analysis for IL-32, IL-10, TNF

Paraffin-embedded tissues were sectioned (3 µm) and collected in series on glass slides coated with 2% 3-aminopropyltriethsilane (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The sections were deparaffinised by immersion in xylene, and then were immersed in alcohol. For antigen retrieval, the sections were immersed in EDTA buffer (pH 9.0) for 30 min, 95°C and then incubated with 3% hydrogen peroxide (Merck SA, RJ, Brazil) for 40 min. Sections were blocked by incubation with Background Sniper (blocked protein, Starr Trek Universal HRP Detection System, Biocare Medical Inc., Concord, CA, USA) for 15 min. The sections were immediately incubated with the following primary rabbit polyclonal antibodies (1:100 dilution): anti-IL32 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), anti-IL10 or anti-TNF (Abcam Inc.), at 4°C, overnight, in a humidified chamber. After washing in Tris-Buffered Saline, the sections were treated with Link Universal Trekie (Starr

Trek Universal HRP Detection System), for 20 min, followed by washing and treatment with TrekAvidin-HRP (Starr Trek Universal HRP Detection System) for 20 min. Sections were then incubated in Betazoid DAB Chromogen solution (Biocare Medical Inc.) and counterstained with Mayer's haematoxylin for 30 s. Negative controls were obtained by omission of the primary antibodies, which were substituted by 1% phosphate-buffered saline (PBS) – Bovine Serum Albumin (Sigma). Sections were coded and blindly analysed by two observers. Expression of cytokines was semi quantitatively scored under light microscopy (400x magnification, 10 fields per section), and classified according scores: 0 (absence of positive cells), 1 (1% - 25% of positive cells), 2 (26% a 50% of positive cells), 3 (51% a 75% of positive cells) and 4 (76% a 100% of positive cells), adapted from Joosten *et al.* [12]. The data were represented as individuals and median values.

Cultures of PBMC and amastigote forms of *Leishmania (V.) braziliensis*

Venous blood was collected in tubes containing EDTA (BD Vacutainer™, Juiz de Fora, MG, Brazil), centrifuged (240 x *g*, 15 min, room temperature) and plasma was discarded. The blood was diluted 1:2 in 0.01 M EDTA-PBS pH 7.3 and layered on Ficoll (Ficoll Paque Plus, GE Healthcare). After centrifugation (1.400 *g*, 15 min, room temperature), PBMC were collected, washed twice in PBS (600 *g*, 10 min, 4°C) and suspended in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco, Brazil), 2 mM L-glutamine (Sigma), 100 U/ml penicillin (Sigma), and 100 µg/ml streptomycin (Sigma). The isolate *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/2003/IMG^{Lb}, from *Leishbank* (West Central region *Leishmania* bank, Universidade Federal de Goiás, Brazil),

characterized as previously described [31], was used to generate amastigote forms based on Ahmed *et al.* [32] and Langet *et al.* [33] with some modifications. Briefly, promastigote forms were cultured in 24-well plates in Grace's insect culture medium (Sigma) supplemented with 20 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Cripion, Andradina, Brazil), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin, at 26°C (6 days). The parasites were washed with PBS and injected subcutaneously ($5 \times 10^6/50 \mu\text{l}$) into one of the hind footpads of IFN γ -deficient mice as previously described [34]. When lesion size was around 2 - 3 mm, animals were sacrificed by CO $_2$ inhalation and the footpads were aseptically collected, macerated in PBS, and layered on Percoll (GE Healthcare; 44% and 100%, 2.500g, 30 min, 10°C) to obtain amastigotes. The PBMC ($1.2 \times 10^6/400 \mu\text{L}$) were cultured with amastigotes ($3 \times 10^5/500 \mu\text{L}$) in duplicates, at 36°C, 5% CO $_2$. After 24 h, PBMC were stored (RNA Store, DNR, Jerusalem, Israel) for further IL-32 investigation.

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) for IL-32 isoforms, TNF and IL-10

From normal tissues, cutaneous or mucosal lesions and PBMC, RNA extraction was done by Trizol method (Invitrogen). The cDNA was synthesized using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) and Real-Time PCR reactions were done in an Applied Biosystems 7500 FAST device using the primers designed by Heinhuis *et al.* [17], and detected by SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, the reactions were done in a 10 µl final volume containing 5 µl of SYBR Green Mastermix, 1 µl of each primer (5 µM), 2 µl of deionised water, and 1 µl of cDNA. The reactions were initialized

with 60°C for 20 s, followed by an step of 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 10 s, and 60°C for 1 min. At the end of the reactions it was performed a melting curve. GAPDH was used as the reference housekeeping gene. The results were analysed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Statistical analyses

Data represent mean $\pm$ standard error mean (SEM), individual values, medians [minimal and maximal values]. Mann Whitney test was performed using GraphPad Prism 5.0 Software Inc. (San Diego, CA, USA). $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Characterization of patients and parasites

As presented in Table 1, 23 patients with CL and 12 with ML were evaluated. In CL, the number of lesions varied from only one until 21. The duration of the disease was higher in ML than in CL, varying from 4 until 120 months. The clinical and histopathological examinations of the lesions revealed that all were ulcerated presenting an intense inflammatory cell infiltration composed by macrophages and lymphocytes and showed a low number of parasites. These cells could be arranged in granulomas containing giant cells. The mean of patient age was 36.9 ± 2.7 years for CL and 50.4 ± 5.0 years for ML patients. All patients were tested for *in vivo* immune cellular response, varying the Montenegro's skin test result from 5 until 35 mm in CL patients (56.4% positive samples), whereas in ML patients it varied from 5 until 50 mm (41.7%

positive samples). Most of patients were infected in Central Brazil (60%), but there were cases from Northern and North-eastern Brazilian regions.

After PCR, there was amplification of the *Leishmania* kDNA in 24 samples (68.6%, 24/35), being 78.2% CL (18/23) and 50% ML (6/12). In these positive samples all parasites belonged to *Viannia* subgenus.

Expression of IL-32 protein is increased in cutaneous and mucosal lesions of ATL patients

The expression of IL-32 was increased in cutaneous lesions (CL: 3 [1 a 4] vs. Controls: 0.5 [0 a 2], $p < 0.05$, Figure 1A, C) as well as in mucosal lesions (ML: 3 [1 a 4] vs. Controls: 1 [0 a 2], $p < 0.05$, Figure 1B, D).

Similar distribution of IL-32 was found in cutaneous or mucosal lesions. As IL-32 can be produced by epithelial cells and mononuclear cells, IL-32 expression was independently determined in the epithelium and inflammatory infiltrate. The IL-32 was found in several cells such as giant cells, endothelial cells, mononuclear cells and keratinocytes/epithelial cells (Figure 2A–D). The expression of IL-32 in cutaneous and mucosal lesions was similarly detected in the epithelium and in the inflammatory infiltrate (Figure 2E, 2F). Comparing the expression of IL-32 detected in the epithelium of cutaneous and mucosal lesions, no significant differences were found. Similar results were also obtained considering the infiltrate.

The isoform IL-32 γ is up-regulated in ATL lesions

As there are different isoforms of IL-32, we investigated the levels of mRNA of the IL-32 isoforms in healthy tissues and in cutaneous and mucosal lesions. Among the IL-32 isoforms investigated (α , β , γ , δ), only IL-32 γ mRNA

was detected. Similar to the protein expression, significantly higher levels of mRNA IL-32 γ was detected in cutaneous and mucosal lesions than in healthy tissues (Figure 3). The isoform IL-32 γ presented 17-fold increase in cutaneous lesions (Figure 3A), and 11-fold increase in mucosal lesions in relation to control tissues (Figure 3B). No significant differences were found when CL was compared with ML (Figure 3C).

TNF but not IL-10 is increased in mucosal leishmaniasis: no association with IL-32

To evaluate the association between IL-32 and other cytokines in ATL, lesions and healthy tissues were submitted to IHC for detecting TNF and IL-10. These cytokines were variably expressed in cutaneous as well as in mucosal lesions (CL: TNF = 3 [0 - 4] vs. Controls: 1 [0 - 1], $p < 0.05$; IL-10 = 4 [0 - 4] vs. Controls: 1 [0 - 1], $p < 0.05$; ML: TNF = 2 [0 - 4] vs. Controls: 0 [0 - 1], $p < 0.05$; IL-10 = 2 [1 - 4] vs. Controls 1 [0 - 1], $p < 0.05$; Figure 4). No differences were detected in levels of TNF or IL-10 between CL and ML lesions. We could not detect any association between TNF or IL-10 levels with IL-32 expression detected by IHC in CL or ML (data not shown).

To confirm and quantify the TNF and IL-10 expression in tissues, a qRT-PCR was performed. Similar to the IHC results, the levels of IL-10 mRNA were similar in cutaneous and mucosal lesions (CL: 328 [120 - 1,396]; ML: 351 [80 - 1,238], Figure 5A e B). However, the levels of TNF mRNA were higher in ML than in CL lesions (ML: 4,069 [924 - 4,030]; CL: 141.0 [29 - 6,889], Figure 5C and 5D). Again, no associations between levels of TNF or IL-10 mRNA with IL-32 mRNA were detected (data not shown).

Amastigotes of *L. (V.) braziliensis* induces IL-32 γ in mononuclear cells

To evaluate whether the protozoan *Leishmania* is able to induce IL-32, PBMC from healthy donors were incubated or not with amastigotes of *L. (V.) braziliensis* for 24 h. By using qRT-PCR four isoforms of IL-32 were searched but only the IL-32 γ mRNA was detected in PBMC cultures. There was an 3-fold increase in IL-32 γ in cells incubated with amastigotes in comparison to cultures without parasites (Figure 6).

Discussion

In the present study it was demonstrated for the first time that IL-32 is produced during *Leishmania* infection. Patients presenting cutaneous or mucosal forms of ATL produced similar levels of IL-32 protein and mRNA in their lesions. The groups of patients presented clinical variations in terms of number of lesions (varying from 1 to 21 lesions, 47.8% with a unique lesion) and time of lesion (varying from 1 to 48 months) in CL as well as in time of lesions in ML (varying from 4 to 120 months). These variations can explain the variability in IL-32 expression as well as in TNF and IL-10 detected in this study.

In ATL lesions, the expression of IL-32 was detected in several kinds of cells, including epithelial, endothelial and mononuclear cells. The IL-32 expression in different cell types has been previously described. In lung of *M. avium* complex-infected patients IL-32 was detected in alveolar macrophages and epithelial cells [8]. The presence of IL-32 in endothelial cells was demonstrated indicating a role for this cytokine in inflammation [35]. In keratinocytes and other epithelial cells, *in vitro* or *in vivo*, during infections or inflammatory diseases IL-32 is produced [7,8,10,36,37,38]. In the present study, IL-32 was detected in giant cells in some patient lesions presenting tuberculoid granuloma. Recently, Schenk et al. [39] showed that IL-32 is expressed in granulomas in leprosy lesions with a higher frequency of IL-32⁺ cells in tuberculoid than in lepromatous lesions. However, the authors did not describe

whether giant cells were positive or not for IL-32. In leprosy, Th1 or Th2 responses are associated with tuberculoid and lepromatous leprosy, respectively. However, in ATL this polarization is not so clear, being detected Th1 as well as Th2 cytokines in cutaneous or mucosal lesions with a predominance of Th1 cytokines [23,25,40]. In some ATL lesions it is possible to detect tuberculoid granuloma [23,41]. The presence of IL-32 in giant cells in ATL granuloma suggests the involvement of this cytokine in tuberculoid granuloma what deserves further investigation.

In this study, only IL-32 γ isoform was detected in CL or ML lesions by using qRT-PCR. The isoforms IL-32 γ and IL-32 α are mainly produced by mononuclear cells after activation [5] and they are detected in nasal mucosa tissue during allergic rhinitis [14]. The IL-32 α is also detected in epithelial cells from colon mucosa during inflammatory bowel disease [9,10] and IL-32 β is expressed in endothelial cells [35] and also in intestinal epithelial cell line [42]. The isoforms IL-32 γ , β and δ have been detected in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [6]. Among the IL-32 isoforms, Choi *et al.* [4] showed that the IL-32 γ is the most active to induce cytokines *in vitro* and *in vivo*. The involvement of IL-32 γ in inflammatory disease such as rheumatoid arthritis has been well characterized [12,13,17]. Based on these observations, although different cells in CL or ML lesions can express IL-32 we suggest that in the infiltrate the production of IL-32 γ in ATL lesions is mainly due to mononuclear cells and it can contribute to chronic inflammatory process during the disease.

Besides the expression of IL-32, TNF and IL-10 were also investigated in ATL lesions. Although a similar TNF protein expression was detected in CL and ML lesions, an exacerbated TNF mRNA expression was detected in ML lesions

in comparison to CL lesions. Similar levels of IL-10 was detected both in protein or mRNA expression in CL and ML lesions. In accordance with our results, Faria *et al.* [26] also described similar levels of TNF and IL-10 proteins in CL and ML lesions. On the other hand, mRNA TNF was also similar and IL-10 was higher in ML than in CL lesions when it was used reverse transcriptase PCR [25,40]. The apparent divergence among these studies may be related to the variability in ATL evolution and clinical characteristics of the patients (duration of disease, number of lesions). In the present study, no correlations between levels of IL-32 protein or mRNA expression and those of TNF or IL-10 were found. IL-32 can induce both TNF [2,12] and IL-10 [11,43]. The IL-32-induced TNF production plays a role in inflammatory diseases such as inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis [10,12]. Also, TNF can induce IL-32 creating an auto inflammatory loop [17]. As the levels of IL-32 and IL-10 expression were similar in CL and ML lesions and TNF was higher expressed in ML, we can suggest that IL-32 cannot be responsible for unbalance between these pro and anti-inflammatory cytokines in ATL. However, together with TNF, and in the presence of low response to IL-10 in ML [26], IL-32 can contribute to the maintenance of the chronic inflammation in this clinical form.

In an attempt to characterize the parasites, a PCR reaction was used according to Passos *et al.* [29] and Volpini *et al.* [30]. Only 68% of the biopsy fragments were positive with all parasites belonging to subgenus *Viannia*. This is the most frequent subgenus of *Leishmania* in South America, specially represented by *L. (V.) braziliensis*, causing CL or ML [44]. In West Central, North and Northeast of Brazil, > 90% of the ATL cases have been reported to be caused by *L. (V.) braziliensis* [45,46]. As 32% of our samples were negative in

PCR, we cannot rule out the possibility that parasites belonging to subgenus *Leishmania* are present. Because we detected 100% of *L. (Viannia)* when PCR was positive, and the high prevalence of *L. (V.) braziliensis* in Brazil, we tested the capacity of this species to induce IL-32 in PBMC. Amastigote forms of *L. (V.) braziliensis* induced IL-32 γ mRNA in healthy donor PBMC. In some cell preparations IL-32 was not induced, however in the presence of IFN γ it could be detected (data not shown). The main cell population in PBMC that produces IL-32 seems to be monocytes [5], suggesting that these cells could be the main source of IL-32 γ in the inflammatory infiltrates of ATL lesions. Only the IL-32 γ isoform was detected in PBMC as well as in ATL lesions, suggesting that the parasites induce only this isoform or even that *L. (Viannia)* sp can inhibit the expression of another IL-32 isoforms. These results suggest that in ATL lesions, IL-32 production can be induced by parasites and cytokines such as IFN γ and TNF. Further experiments are needed to understand the mechanisms of IL-32 induction by *Leishmania*.

Besides the role of IL-32 in chronic inflammatory diseases [10,12] it has been demonstrated that this cytokine can be induced during infections and plays a role in immune response against pathogens [5,8]. In mycobacteria-infected cells IL-32 controls the bacteria growth [20]. Also against viral infections IL-32 plays a role in defence mechanisms [18,19,36]. Based on these observations, a role of IL-32 γ in *L. (Viannia)* sp control must be further investigated since this cytokine is present in both CL and ML lesions and is induced by amastigotes in PBMC. This study opens new perspectives on the understanding of immunopathogenesis and control of leishmaniasis caused by New World *Leishmania*.

Table 1. Characteristics of ATL patients

Characteristics	CL^a	ML^b
Male	18	7
Female	5	5
Age	36.9 ± 2.7 ^c	50.4 ± 5.0
Number of	3.3 ± 1.0	---
Time of lesions^d	8.3 ± 3.0	32.0 ± 6.0
MST (mm)^e	18.0 ± 2.0	18.0 ± 3.0

FIGURE 1

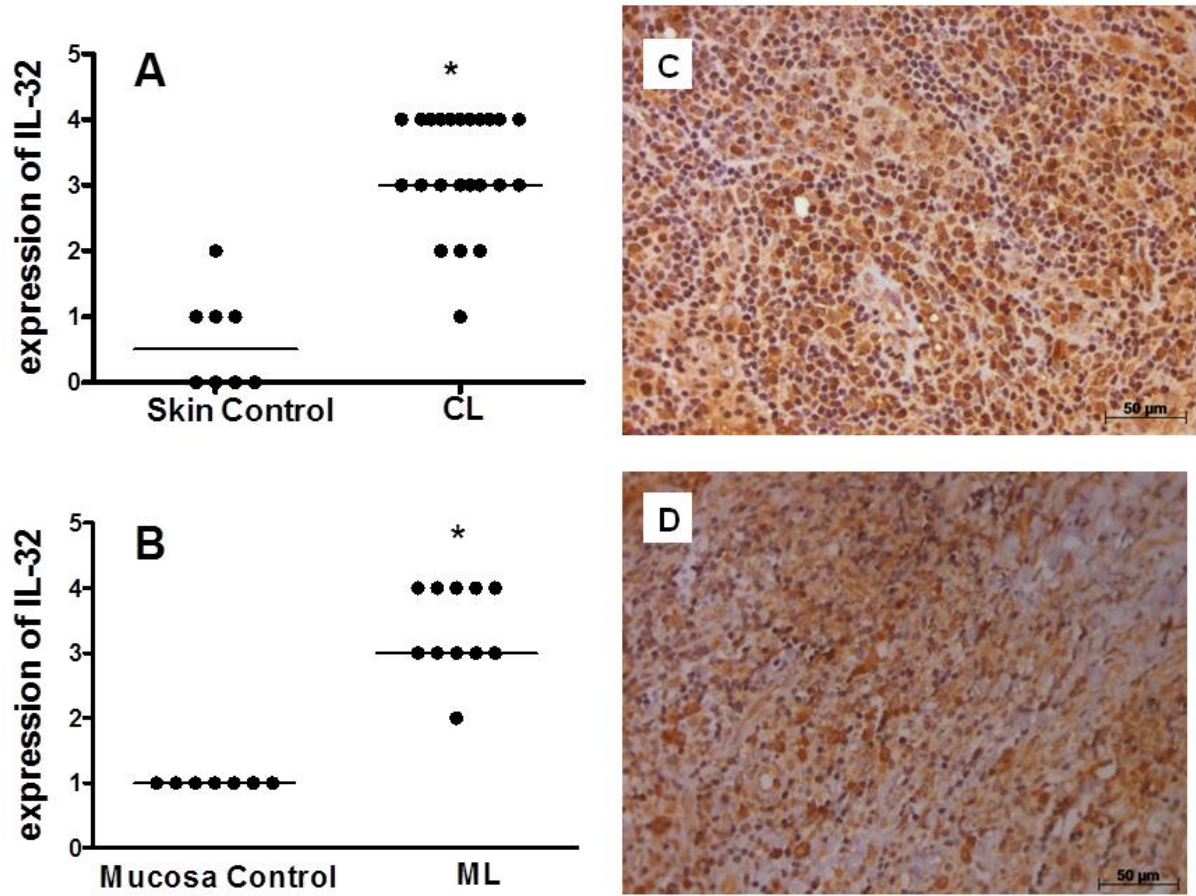


FIGURE 2

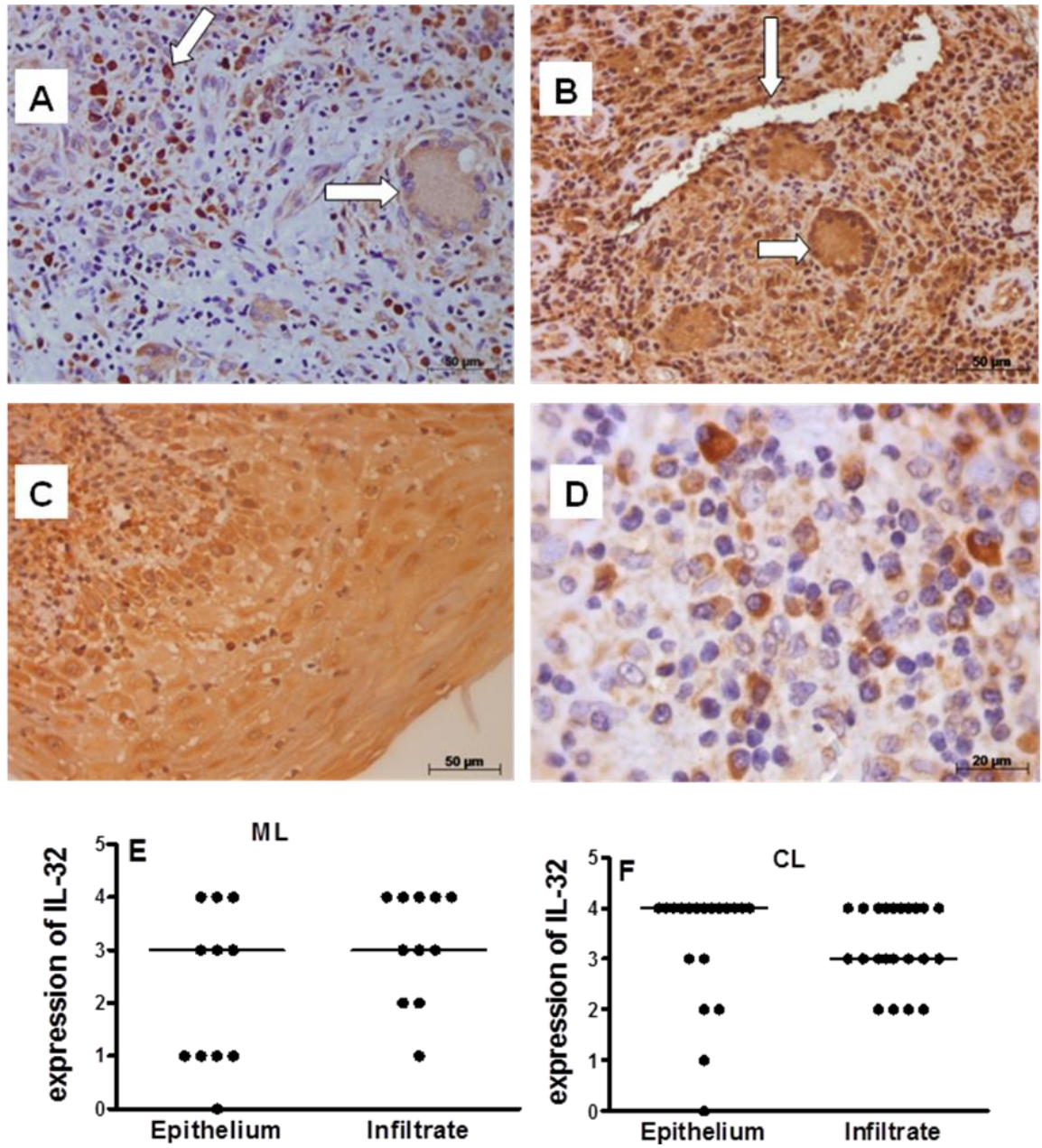


FIGURE 3

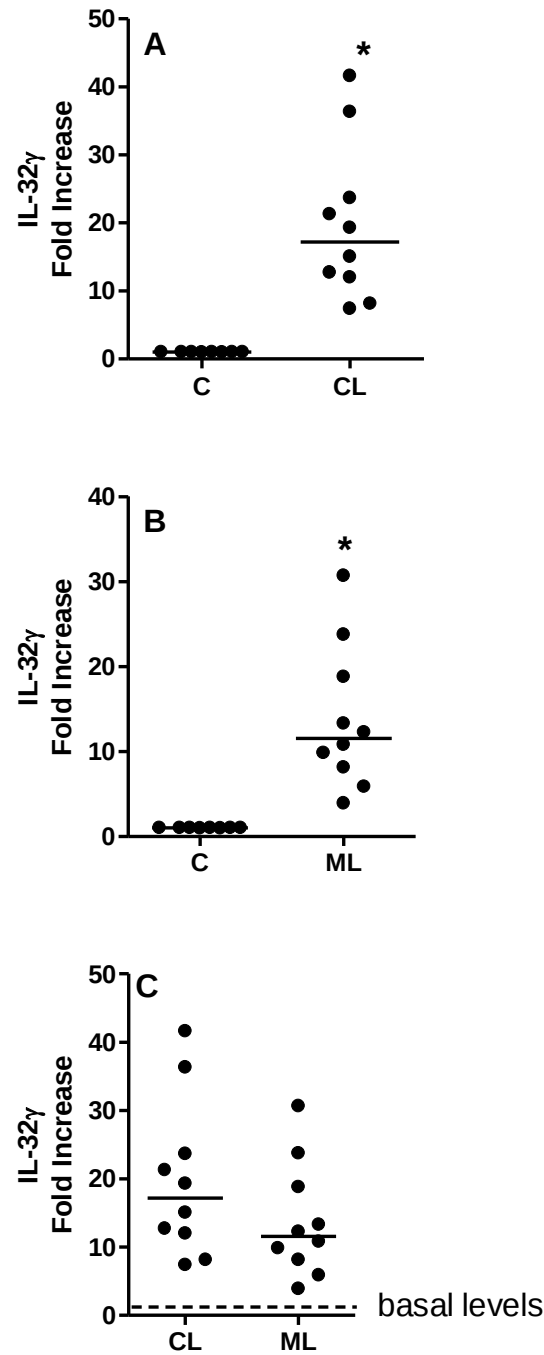


FIGURE 4

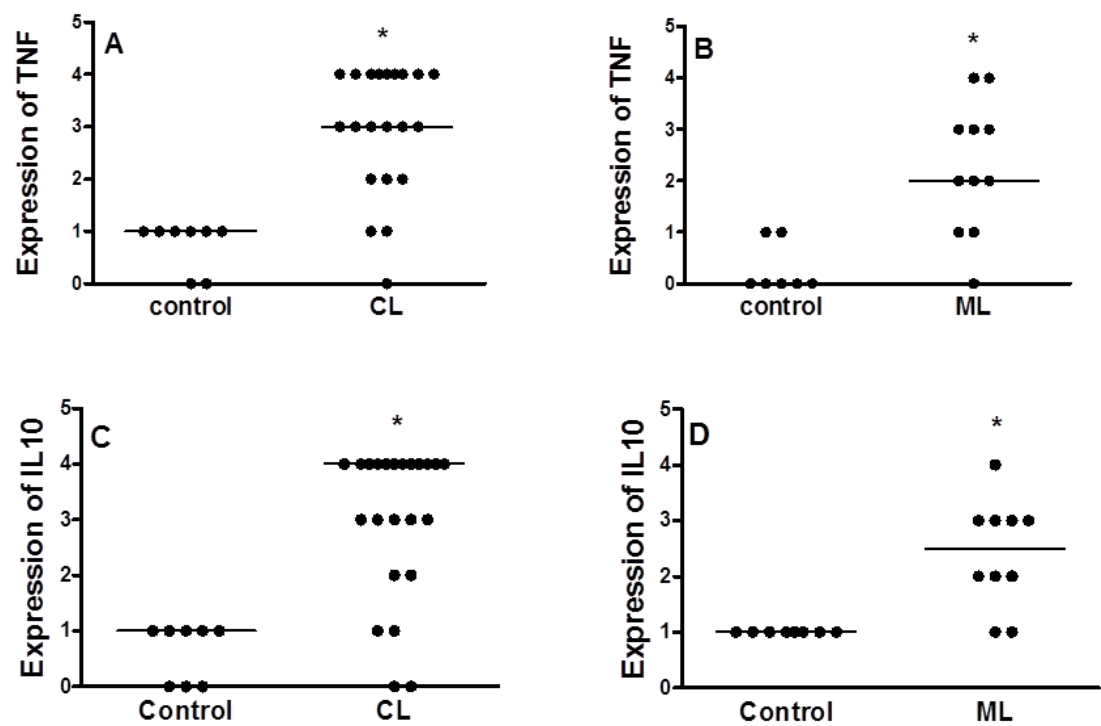


FIGURE 5

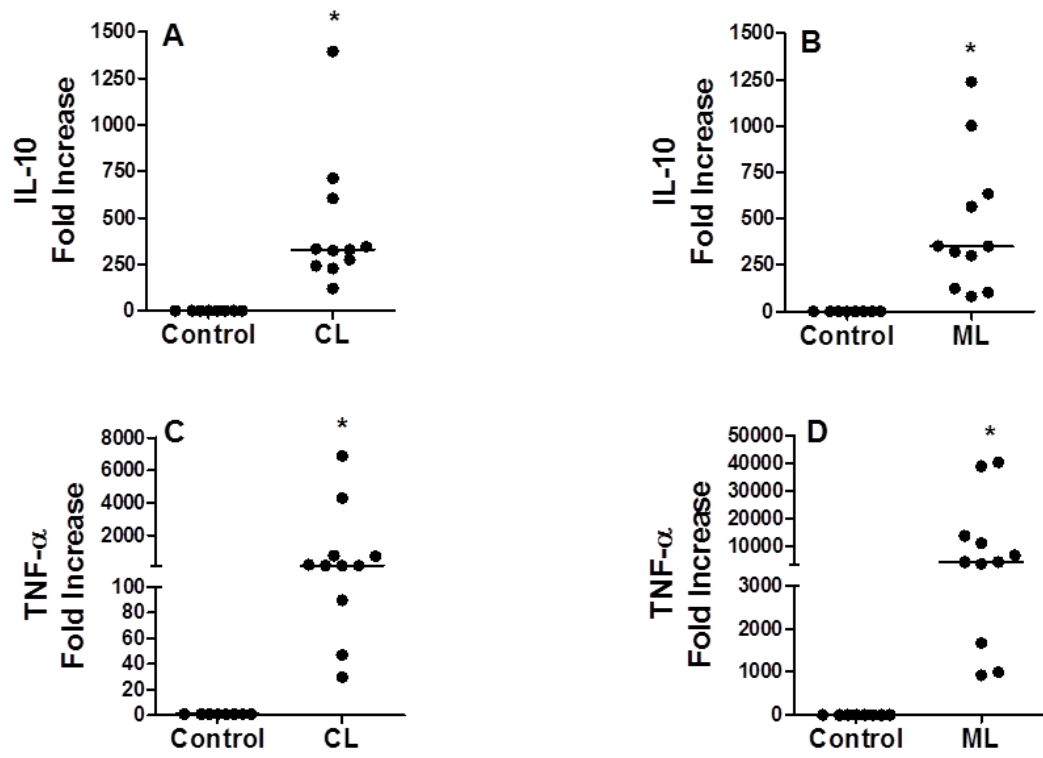
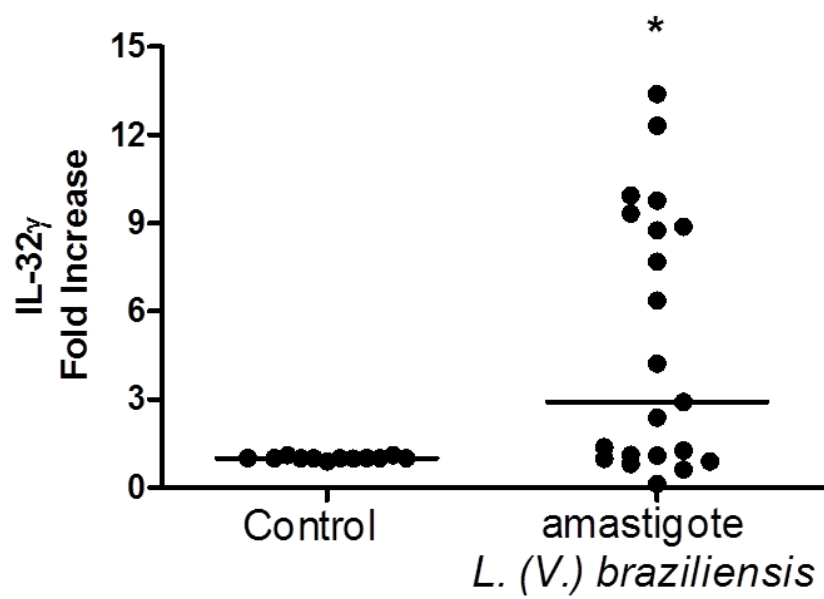


FIGURE 6



LEGENDS

Table 1- Thirty five ATL patients who were assisted at Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad (Goiânia - Goiás, West Central, Brazil), 23 with ^aCL (Cutaneous Leishmaniasis - localized, and disseminated = > 20 lesions) and 12 with ^bML (mucosal leishmaniasis). ^cMean $\pm$ SEM. ^dTime in months; ^eMST: Montenegro's skin test (mm; 13/23 positives in CL [56.4%]; 5/12 positives in ML [41.7%]).

Figure 1. IL-32 is detected in cutaneous and mucosal lesions of ATL patients. Fragments of cutaneous lesions (CL, **A**) or mucosal lesions (ML, **B**) and healthy tissues were included in paraffin and sections were submitted to IHC for IL-32. After reaction, the expression of IL-32 was determined through positive cells, analysed under light microscopy (400x). The data represent individuals and medians values. $*p < 0.05$ **A:** IL-32 detected in CL patients (n = 23) or healthy skin (Controls, n = 7). **B:** IL-32 detected in ML patients (n = 12) or healthy mucosa (Controls, n = 8). **C:** photomicrography of CL lesion. **D:** photomicrography of ML lesion.

Figure 2. Expression of IL-32 was detected in several cells. Fragments of cutaneous or mucosal lesions were included in paraffin and sections were submitted to IHC for IL-32. The arrows show positive cells: (A-B-D) mononuclear cells, (B) endothelial cells, (A-B) giant cells, (C) keratinocytes. After reaction, the expression of IL-32 was determined through positive cells, analysed under light microscopy (400x). The data represent individual and median values (E, ML; F, CL).

Figure 3. Similar levels of IL-32 γ mRNA in lesions of patients with cutaneous (CL) and mucosal (ML) leishmaniasis. Total RNA was extracted from fragments of healthy tissues, cutaneous lesions (A) or mucosal lesions (B) and analysed by qRT-PCR. Expression of isoforms α , β , γ and δ of IL-32 were analysed but only γ IL-32 mRNA was detected (results shown are individual values and medians; ML: n = 10; CL: n = 10). In C, comparison between CL vs. ML. $*p < 0.05$

Figure 4. Expression of TNF and IL-10 was increased in cutaneous and mucosal lesions of ATL patients. Fragments of cutaneous, mucosal and healthy tissues were included in paraffin and sections were submitted to IHC for TNF (A and B) and IL-10 (C and D). After reaction, the expression of cytokines was determined through quantification of positive cells, under light microscopy (400x). Data represent individual and median values. $*p < 0.05$.

Figure 5. Increase of TNF mRNA but not IL-10 mRNA in lesions of patients with mucosal leishmaniasis. Total mRNA was extracted from fragments of healthy tissues, cutaneous (CL, A, C) or mucosal (ML, B, D) lesions and the expressions of IL-10 (A, C) and TNF mRNA (C, D) was analysed by using real-time PCR. Results are showed as individual and median values; $n = 11$, $*p < 0.05$.

Figure 6. *Leishmania (V.) braziliensis* induces IL-32 γ mRNA in human mononuclear cells. The mononuclear cells ($3 \times 10^6/\text{mL}$) from healthy blood donors were incubated with amastigotes forms of *L. (V.) braziliensis* ($3 \times 10^5/\text{well}$) for 24 h. The IL-32 γ mRNA was analysed by qRT-PCR. Data represent individual values and medians ($n = 21$, $*p < 0.05$).

Conclusions

This study shows that IL-32 is expressed in lesions of ATL patients. This is the first report about IL-32 in protozoan disease. IL-32 is expressed in several cells present in the leishmaniasis lesions (epithelial and endothelial cells, mononuclear cells, giant cells). The IL-32 γ is the unique isoform expressed in lesions. No significant differences between IL-32 levels of expression in CL and ML are detected. However, in ML there is higher expression of TNF than in CL. *Leishmania (V.) braziliensis* is able to induce IL-32 γ in PBMC obtained from healthy donors. This study points IL-32 as a target to be investigated in immunopathogenesis and control of ATL.

Conflicts of interests

Authors declare that there are not any financial competing interests in relation to this manuscript.

Author contribution statement

HGJr performed the majority of the experiments helped by AEM, CMG, LLP and FMS. LIPA, FBD and SAP were responsible for diagnosis and follow up of the patients. AKAF and MLD performed the experiments of parasite identification. ACB supervised all immunohistochemical experiments. MMT supervised qRT-PCR. FRD, ACB, LQV and LABJ conceived the experiments and analysed the data. FRD and HGJr wrote the manuscript. MAPO, LQV and LABJ provided suggestions on the manuscript. FRD supervised the research.

Acknowledgements

The authors thank Bas Heinhuis and Arissa Felipe Borges for technical assistance. This research was supported by CNPq (471073/2009-1) and CAPES

(PROCAD NF 179), Brazil. HGJr was a fellow of FAPEG, Goiás, Brazil; AEM and LLP were fellows of CNPq, Brazil.

References

- 1-Dahl CA, Schall RP, He HL, Cairns JS: **Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells.** *J Immunol* 1992, **148**: 597–603.
- 2- Kim SH, Han SY, Azam T, Yoon DY, Dinarello CA: **Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF alpha.** *Immunity* 2005, **22**: 131-142.
- 3-Goda C, Kanaji T, Kanaji S, Tanaka G, Arima K, Ohno S, Izuhara K: **Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells.** *Int Immunol* 2006, **18**: 233-240.
- 4- Choi JD, Bae SY, Hong JW, Azam T, Dinarello CA, Her E, Choi WS, Kim BK, Lee CK, Yoon DY, Kim SJ, Kim SH: **Identification of the most active interleukin-32 isoform.** *Immunology* 2009, **126**: 535-42.
- 5-Netea MG, Azam T, Lewis EC, Joosten LA, Wang M, Langenberg D, Meng X, Chan ED, Yoon DY, Ottenhoff T, Kim SH, Dinarello CA: ***Mycobacterium tuberculosis* induces interleukin-32 production through a caspase-1/IL-18/interferon-gamma-dependent mechanism.** *PLoS Med* 2006, **3**: 1310-1329.
- 6- Alsaleh G, Sparsa L, Chatelus E, Ehlinger M, Gottenberg JE, Wachsmann D, Sibilia J: **Innate immunity triggers IL-32 expression by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**: 135-146.
- 7-Meyer N, Zimmermann M, Burgler S, Bassin C, Woehrl S, Moritz K, Rhyner C, Indermitte P, Schmid-Grendelmeier P, Akdis M, Menz G, Akdis CA: **IL-32 is expressed by human primary keratinocytes and modulates keratinocyte apoptosis in atopic dermatitis.** *J Allergy Clin Immunol* 2010, **125**: 858-865.

- 8- Bai X; Ovrutsky A R, Kartalija M, Chmura K, Kamali A, Honda JR, Oberley-deegan RE, Dinarello CA, Crapo JD, Chang L, Chan ED: **IL-32 expression in the airway epithelial cells of patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease.** *Int Immunol* 2011, **23**: 679-691.
- 9-Netea MG, Azam T, Ferwerda G, Girardin SE, Walsh M, Park JS, Abraham E, Kim JM, Yoon DY, Dinarello CA, Kim SH: **IL-32 synergizes with nucleotide oligomerization domain (NOD) 1 and NOD2 ligands for IL-1 β and IL-6 production through a caspase 1-dependent mechanism.** *Proc Natl Acad Sci* 2005, **102**: 16309-16314.
- 10-Shioya M, Nishida A, Yagi Y, Ogawa A, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y, Andoh A: **Epithelial overexpression of interleukin-32 alpha in inflammatory bowel disease.** *Clin Exp Immunol* 2007, **149**: 480-486.
- 11-Kang JW, Choi SC, Cho MC, Kim HJ, Kim JH, Lim JS, Kim SH, Han JY, Yoon DY: **A proinflammatory cytokine interleukin-32 beta promotes the production of an anti-inflammatory cytokine interleukin-10.** *Immunology* 2009, **128**: 532-540.
- 12-Joosten LA, Netea MG, Kim SH, Yoon DY, Oppers-Walgreen B, Radstake TR, Barrera P, van de Loo FA, Dinarello CA, van den Berg WB: **IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis.** *Proc Natl Acad Sci* 2006, **103**: 3298-3303.
- 13-Heinhuis B, Koenders MI, Lent, Peter L E M Van, van de Loo FA, Dinarello CA, Joosten LA ,van den Berg WB: **IL-32 γ and *Streptococcus pyogenes* cell wall fragments synergise for IL-1-dependent destructive arthritis via upregulation of TLR-2 and NOD2.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**:1866-1872.

14-Jeong HJ, Shin SY, Oh HA, Kim MH, Cho JS, Kim HM: **IL-32 up-regulation is associated with inflammatory cytokine production in allergic rhinitis.** *J Pathol* 2011, **222**: 553-563.

15-Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K: **Interactions between IL-32 and tumour necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases.** *Arthritis Res Ther* 2006; **8**: 166-179.

16-Hong J, Bae S, Kang Y, Yoon D, Bai X, Chan ED, Azam T, Dinarello CA: **Suppressing IL-32 in monocytes impairs the induction of the proinflammatory cytokines TNF alpha and IL-1 beta.** *Cytokine* 2010; **49**: 171-176.

17-Heinhuis B, Koenders MI, van Riel PL, van de Loo FA, Dinarello CA, Netea MG, van den Berg WB, Joosten LA: **Tumour necrosis factor alpha-driven IL-32 expression in rheumatoid arthritis synovial tissue amplifies an inflammatory cascade.** *Ann Rheum Dis* 2011, **70**: 660-667.

18-Bae S, Kang D, Hong J, Chung B, Choi J, Jhun H, Hong K, Kim E, Jo S, Lee S, Kim S H, Kim S: **Characterizing antiviral mechanism of interleukin-32 and a circulating soluble isoform in viral infection.** *Cytokine* 2012, **58**: 79 - 86.

19-Rasool ST, Tang H, Wu J, Li W, Mukhtar MM, Zhang J, Mu Y, Xing HX, Zhu Y: **Increased level of IL-32 during human immunodeficiency virus infection suppresses HIV replication.** *Immunol Lett* 2008, **117**: 161-167.

20- Bai X, Kim SH, Azam T, McGibney MT, Huang H, Dinarello CA, Chan ED: **IL-32 is a host protective cytokine against *Mycobacterium tuberculosis* in differentiated THP-1 human macrophages.** *J Immunol* 2010, **184**: 3830-3840.

21-Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S: **Cutaneous leishmaniasis.** *Lancet Infect Dis* 2007, **7**: 581-596.

22-Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Abegão R, de Camargo R, Duarte MI, Neto VA: **Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009, **23**: 1026 - 1034.

23-Silveira FT, Lainson R, Corbett CE: **Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, **99**: 239-251.

24-Liew FY, Li Y, Millott S: **Tumour necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide.** *J Immunol* 1990, **145**: 4306-4310.

25-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* 1993, **91**: 500-505.

26-Faria DR, Gollob KJ, Barbosa JR, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, De Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO: **Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis.** *Infect Immun* 2005, **73**: 7853-7859.

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

28-Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM: **Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human**

***Leishmania (Viannia) braziliensis* infection?** *Clin Exp Immunol* 2007, **149**:440-444.

29-Passos VM, Lasmar EB, Gontijo CM, Fernandes O, Degraive W: **Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996, **91**: 19-20.

30-Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ: **PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis.** *Acta Tropica* 2004, **90**: 31-37.

31-Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR: **In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B.** *Trop Med Int Health* 2010, **15**: 68-76.

32- Ahmed S, Colmenares M, Soong L, Goldsmith-Pestana K, Munstermann L, Molina R, McMahon-Pratt D: **Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis.** *Infection and Immunity* 2006, **71**: 401-410.

33-Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G: **Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice.** *Cellular Microbiology* 2005, **7**: 383 - 392.

34-Oliveira MAP, Pires AS, Bastos RS, Lima GMCA, Pinto SA, Pereira LIA, Pereira AJCS, Abrahamsohn IA, Dorta ML, Ribeiro-Dias F: ***Leishmania spp.* parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2010, **52**: 83-88.

- 35-Kobayashi H, Yazlovitskaya EM, Lin PC: **Interleukin-32 positively regulates radiation-induced vascular inflammation.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010, **74**: 1573-1579.
- 36- Li W, Liu Y, Mukhtar MM, Gong R, Pan Y, Rasool ST, Gao Y, Kang L, Hao Q, Peng G, Chen Y, Chen X, Wu J, Zhu Y: **Activation of interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to influenza A virus infection.** *PLoS One* 2008, **3**: 1-9.
- 37-Keswani A, Chustz RT, Suh L, Carter R, Peters AT, Tan BK, Chandra R, Kim SH, Azam T, Dinarello CA, Kern RC, Schleimer RP, Kato A: **Differential expression of interleukin-32 in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps.** *Allergy* 2012, **67**: 25-32
- 38-Soyka MB, Treis A, Eiwegger T, Menz G, Zhang S, Holzmann D, Akdis CA, Meyer N: **Regulation and expression of IL-32 in chronic rhinosinusitis.** *Allergy* 2012, **67**: 790-798.
- 39-Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, Lee DJ, Teles RM, Ochoa MT, Komisopoulou E, Sarno EN, Rea TH, Graeber TG, Kim S, Cheng G, Modlin RL: **NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy.** *Nat Med* 2012, **18**: 555-563.
- 40-Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL: **Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis.** *J Clin Invest* 1993, **91**: 1390-1395.
- 41-Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJ, Oliveira MP, Rutowitsch MS, Da-Cruz AM: **Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro.** *Int J Dermatol* 2008, **47**: 926-32.

42-Hasegawa H, Thomas HJ, Schooley K, Born TL: **Native IL-32 is released from intestinal epithelial cells via a non-classical secretory pathway as a membrane-associated protein.** *Cytokine* 2011, **53**: 74-83.

43-Choi J, Bae S, Hong J, Ryoo S, Jhun H, Hong K, Yoon D, Lee S, Her E, Choi W, Kim J, Azam T, Dinarello CA, Kim S: **Paradoxical effects of constitutive human IL-32{gamma} in transgenic mice during experimental colitis.** *Proc Natl Acad Sci* 2010, **107**: 21082-21086.

44-Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, Wiese K, Golightly L, Fikrig E, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD: **Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*.** *J Infect Dis* 1987, **156**:73-83.

45-Carvalho ML, de Andrade AS, Fontes CJ, Hueb M, de Oliveira Silva S, Melo MN: ***Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil.** *Acta Trop* 2006, **98**: 277-285.

46-Brito ME, Andrade MS, Dantas-Torres F, Rodrigues EH, Cavalcanti MD, Almeida A M, Brandão-Filho SP: **Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2012, **45**: 425-429.

Artigo 2:

Título: Formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* induzem produção de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 10 (IL-10) de maneira dependente de toll-like receptor 4 (TLR4) em células mononucleares humanas.

Autores: Hélio Galdino Jr, Lívia Lara Pessoni, Anetícia Eduarda Maldaner, Stéfanne Madalena Marques, Miriam L. Dorta, Milton A. P. de Oliveira, Fátima Ribeiro-Dias

Submetido: Revista Cytokine - Em revisão para publicação.

Formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* induzem produção de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 10 (IL-10) de maneira dependente de toll-like receptor 4 (TLR4) em células mononucleares humanas.

Hélio Galdino Jr, Livia Lara Pessoni, Anetícia Eduarda Maldaner, Stéfanne Madalena Marques, Miriam L. Dorta, Milton A. P. de Oliveira, Fátima Ribeiro-Dias

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

Correspondência: Profa. Dra. Fátima Ribeiro-Dias, Setor de Imunologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás – Rua 235 S/N – Setor Universitário – Goiânia – GO, Brasil; 74605-050; fone: (55) 62 3209 6116; Fax: (55) 62 3209 6363; e-mail: fatimardias@gmail.com; fdias@iptsp.ufg.br.

Título curto: *Leishmania braziliensis* induces TNF and IL-10 via TLR4

Palavras chaves: leishmania, human, TLR4, amastigotas, citocinas

Resumo:

O papel dos Toll Like Receptors (TLR) na infecção por *Leishmania* tem sido investigado, no entanto, há poucos estudos com a espécie *L. (V.) braziliensis*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação de TLR4 na indução de citocinas em culturas de células mononucleares humanas (CMN) incubadas com as formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e a capacidade destas formas em modular a expressão de TLR4 em monócitos/macrófagos. Formas amastigotas foram obtidas de lesões de camundongos. As CMN foram cultivadas na ausência ou na presença de IFN γ , anticorpos neutralizantes de TLR4 (1 h antes da infecção) e agonista de TLR4. As concentrações de TNF e IL-10 foram determinadas por ELISA nos sobrenadantes das culturas e as CMN foram colhidas para análise da expressão de TLR4 por citometria de fluxo. As CMN sensibilizadas com IFN γ produziram TNF e IL-10 após incubação com os parasitos. A produção das

citocinas foi inibida pela neutralização de TLR4 e a ativação das CMN via TLR4 com LPS aumentou a produção do TNF induzido pelas amastigotas, mas não alterou a produção da IL-10. A incubação com IFN γ aumentou significativamente a porcentagem de células TLR4⁺ ($p < 0,05$), sendo que nos indivíduos com menor resposta ao IFN γ , a exposição às formas amastigotas diminuiu a porcentagem de células TLR4⁺ ($p = 0,06$). Os dados sugerem a participação de TLR4 na ativação das CMN humanas por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

1. Introdução:

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, acometendo pele e/ou mucosas [1]. No mundo, a leishmaniose cutânea atinge cerca de 1,2 milhões de pessoas, destes 66,941 casos estão concentrados nas Américas e estimativas apontam uma taxa de incidência anual de até 307,800 novos casos no continente americano [2]. No Brasil, *L. (Viannia) braziliensis* é a principal causadora da LTA, podendo levar ao desenvolvimento das formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL) ou disseminada (LCD) e a forma mucosa (LM). Durante seu ciclo de vida, o parasito exibe duas formas, a promastigota no hospedeiro invertebrado, a qual, por sua vez, se diferencia em amastigota, após a entrada na célula hospedeira [1,3].

Após a detecção inicial de micróbios invasores, uma resposta imune inata é desencadeada, levando à produção de moléculas que contribuem para conter a infecção inicial e para montar a posterior resposta imune adaptativa [4]. Entre os receptores responsáveis pelo reconhecimento dos patógenos, estão os receptores membros da família dos receptores similares a proteína *Toll* (TLR). Estes receptores são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), como glicolipídeos, peptidoglicanos e lipopeptídeos, que são compartilhados por grandes grupos de microrganismos [5]. Assim, o TLR4 é um receptor para o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas [6], entre outros ligantes [7], enquanto o TLR2 forma heterodímeros com TLR1 ou TLR6 para reconhecer lipopeptídeos [8].

O papel dos TLR na infecção por *Leishmania* tem sido explorado por vários pesquisadores. de Veer et al. [9] demonstraram que o TLR2 é acionado por glicolipídeos presentes na membrana de *L. major*. No mesmo ano, [10] mostraram que o

lipofosfoglicano (LPG) de *L. major* induz um aumento da expressão de TLR2, bem como a produção de interferon gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral (TNF) por células NK humanas. A ativação de TLR2 por LPG e proteofosfoglicano (PPG), purificados de *L. major*, induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), IFN γ e interleucina 12 (IL-12) em culturas de células mononucleares do sangue periférico humano (CMN), indicando que o TLR2 parece ser necessário para a montagem de uma resposta imune celular eficaz [11]. No entanto, outros trabalhos apontam que o TLR2 pode favorecer a infecção por *L. (L.) amazonensis*, como mostrado por Guerra et al. [12]. Esses estudos sugerem que a função do TLR2 frente a infecção por *Leishmania* pode ser dependente da espécie.

Um importante papel para o TLR4 no controle da infecção por *L. major* em camundongos, foi demonstrado por Kropf et al.[13]. Estes autores mostraram que o mecanismo de controle do crescimento do parasito, induzido via TLR4, foi por meio da indução da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que leva à produção de óxido nítrico (NO). O mesmo estudo mostrou que nos camundongos deficientes de TLR4, a atividade da enzima arginase estava aumentada, o que causa o aumento de poliaminas, contribuindo, desta forma, para o crescimento do parasito nos macrófagos. Um importante papel para TLR4 e TLR9 no controle da infecção de macrófagos humanos (células THP1) por *L. donovani* foi evidenciado. Os autores observaram que o miltefosine, um fármaco utilizado para o tratamento da leishmaniose, aumentou a expressão de TLR4 e TLR9, o que levou a indução de citocinas do tipo Th1 (IFN γ , TNF e IL-12) e reduziu a produção de IL-10 e fator transformador do crescimento β (TGF β), promovendo o controle da infecção. Resultado similar foi obtido com as CMN de pacientes com leishmaniose visceral tratados com miltefosine. A ativação de TLRs emergiu como uma promissora alternativa para melhorar a eficácia da imunoterapia [14]. Raman et al. [15] mostraram que a vacinação terapeutica utilizando L110f (uma proteína contendo uma combinação de três antígenos de *L. major*, TSA, STI e LeIF) em combinação com ligantes de TLR4 e TLR9 em camundongos BALB/c infectados com *L. major* aumentou a eficácia do antígeno L110F para reduzir o tamanho da lesão e da carga parasitária, pois aumentou a resposta Th1. Os mesmos agonistas de TLRs foram eficazes como adjuvantes, juntamente com antígeno de *L. donovani* (rPxn4), direcionando uma resposta imune tipo Th1 em camundongos [16].

Apesar das recentes demonstrações da importância dos TLRs na resposta imune frente a infecções por diferentes espécies de *Leishmania*, poucos estudos têm aprofundado no papel dos TLR na infecção por *L. (V.) braziliensis*. Camundongos deficientes em MyD88, a infecção com *L. (V.) braziliensis* causou uma menor ativação de células dendríticas, baixa produção de IL-12, resultando em maior suscetibilidade à infecção, desenvolvendo lesões maiores e de duração mais prolongada do que em camundongos controles, sugerindo um papel para os TLRs no controle da infecção [17]. O mesmo estudo mostrou que a infecção em camundongos deficientes em TLR2 leva a uma maior ativação das células dendríticas e maior produção de IL-12, gerando uma maior resistência à infecção, desta forma, sugerindo que outros TLR, que não o TLR2, podem estar envolvidos no controle inicial da infecção. Recentemente foi mostrado que camundongos deficientes em TLR9 infectados com *L. (V.) braziliensis* exibem uma menor ativação das células dendríticas, maior suscetibilidade à infecção com aumento do tamanho das lesões e da carga parasitária do que os camundongos controles, mostrando que a ativação de TLR9 é importante para o controle inicial da infecção [18]. Ainda não foram realizados estudos de infecção com *L. (V.) braziliensis* em camundongos deficientes em TLR4 ou do papel deste receptor em macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis*, porém um estudo avaliou o papel do TLR4 na infecção por *L. (V.) panamensis*, que pertence ao mesmo subgênero [19]. Neste estudo, os autores utilizaram macrófagos de camundongos deficientes em TLR4 e mostraram que a indução de TNF pelo parasito foi abolida na ausência deste receptor. Além disto, mostraram que a atividade leishmanicida nas primeiras horas da infecção foi mediada por TLR4, resultado similar foi encontrado com células U937, uma linhagem de monócitos/macrófagos humanos.

Ainda não foi avaliado se amastigotas de *L. (V.) braziliensis* ativam TLR4 ou modula a expressão destes receptores em células humanas. Assim, este estudo investigou a participação de TLR4 na ativação de CMN humanas cultivadas com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, avaliando a produção de TNF e IL-10 e verificando se a infecção com a forma amastigota é capaz de modular a expressão de TLR4.

2. Materiais e Métodos

2.1 Obtenção do sangue periférico humano e manutenção do animais: Foram incluídos doadores saudáveis, maiores de 18 anos (Doadores do Banco de Sangue do

Hospital das Clínicas/UFG e Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia), que leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, antes de doarem o sangue. O sangue venoso foi colhido em tubos vacutainer (BD Vacutainer™, Juiz de Fora, MG, Brasil), contendo EDTA como anticoagulante. Os camundongos deficientes em IFN γ , C57BL/6, de ambos os gêneros, foram mantidos no biotério do IPTSP/UFG, em condições livres de microrganismos patogênicos, ração e água autoclavada *ad libitum* e ciclo de luz de 12 h. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (protocolo N 165/08).

2.2 Obtenção de células mononucleares (CMN) do sangue periférico: O sangue foi aplicado sobre gradiente de densidade (Ficoll, GE Healthcare, Suíça) e em seguida centrifugado (1.500 g, 15 min, à temperatura ambiente, T.a.). O anel de CMN foi colhido e as células foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,2), contendo 0,01 M de EDTA (PBS-EDTA), sendo a primeira centrifugação a 700 g, 10 min, T.a e a segunda, a 200 g, 10 min, T.a. As CMN foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Life Technologies, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina, 11 mM de bicarbonato de Sódio, 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina (Sigma), referido como meio completo. A viabilidade celular foi avaliada com azul tripan 0,01% em PBS, sendo as células usadas somente quando a viabilidade foi maior do que 90%. As CMN foram quantificadas e distribuídas ($1,5 \times 10^6$ células/ 400 μ L) em placas de 24 poços (Corning Costar, NY, EUA).

2.3 Cultivo dos parasitos e obtenção das formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*: O isolado MHOM/BR/2003/IMG (IMG3), obtido de lesão cutânea de um paciente com LCL, (*Leishbank* IPTSP/UFG), caracterizado por Zauli-Nascimento et al. [20], foram cultivados (26 °C) em meio Grace (Grace's Insect Medium, Sigma) suplementado com 20% de SFB (Gibco) inativado, 2 mM de L-glutamina (Sigma), 100 U/ml de penicilina (Sigma) e 100 μ g/ml de estreptomicina (Sigma). Os parasitos, na fase estacionária do crescimento (6º dia), foram lavados em PBS (1.500 g, 15 min, 10 °C) três vezes e depois quantificados em hematocítômetro, após fixação em PBS contendo 0,1% de formaldeído (Synth, São Paulo, Brasil). Os parasitos foram inoculados (5×10^6) no coxim plantar das patas traseiras de camundongos C57BL/6 deficientes em IFN γ , para a obtenção das formas amastigotas, de acordo com protocolo descrito anteriormente [21,22].

Brevemente, após o desenvolvimento das lesões, cerca de 3-4 semanas, os camundongos infectados foram eutanasiados e as lesões foram retiradas. As lesões foram maceradas em PBS e a suspensão foi centrifugada (114 g, 5 min, 10°C) para retirar os fragmentos do tecido. Após lavagem em PBS (1.500 g, 15 min, 10 °C), foi realizada a lise das hemácias (solução 90% NH₄Cl 0,16 M; 10% Tris 0,17 M), seguida de lavagem com PBS (1.500 g, 15 min, 10 °C). Aos parasitos ressuspensos em 1 ml de PBS foram adicionados 900 µL de Percoll 100%. A suspensão foi homogeneizada, sobreposta de 1 ml de Percoll 44% e 1 ml de PBS. Após centrifugação (2.500g, 30 min, 10 °C), foram obtidos dois anéis e as formas amastigotas foram recuperadas do anel de Percoll 100%. Em seguida, as formas amastigotas foram lavadas em PBS (2.500 g, 20 min, 10 °C), ressuspensas em PBS e quantificadas em hematocítômetro.

2.4 Culturas de CMN e tratamentos: As CMN ($1,5 \times 10^6$ células/400 µL) foram cultivadas ou não com IFN γ recombinante humano (100 U/ml [5 ng/ml], Preprotech, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 24 h, 37 °C, 5% de CO₂. As células tratadas com IFN γ foram incubadas na ausência ou na presença de anticorpos neutralizantes de TLR4 (100 µg/ml; HTA125, Biolegend, San Diego, CA, EUA), 1 h antes da adição das formas amastigotas. Após, as CMN foram incubadas com as formas amastigotas (3×10^5 parasitos/poço, numa relação parasito:CMN de 1:5 ou ~2,0 a 4,0 parasitos por monócito, considerando 5 a 10% de monócitos nas preparações de CMN), por 24 h (36 °C, 5% CO₂). As CMN tratadas com IFN γ e expostas ou não às formas amastigotas também foram incubadas na ausência ou na presença de agonista de TLR4 (LPS de *E. coli* 0111:B4, Sigma; 1 µg/ml), adicionado junto com as formas amastigotas. Após 24 h (36 °C, 5% CO₂), os sobrenadantes foram colhidos e congelados (-80 °C) para posterior dosagem de citocinas.

2.5 Dosagem de TNF e IL-10 por ensaio imunoenzimático (ELISA sanduíche): As citocinas foram dosadas nos sobrenadantes das culturas. As microplacas para ELISA (Corning Costar) foram sensibilizadas com o primeiro anticorpo monoclonal anti-TNF (2,5 µg/ml, clone B154.9, 1 h 30 min, 37 °C) ou anti-IL-10 (clone JES907, 5 µg/ml, 18 h, 4 °C). Após incubação, foram realizadas lavagens com PBS-tween 20 a 0,04% e as placas foram bloqueadas (PBS 3% de SFB; 40 min, T.a.). Em seguida, foram adicionadas as amostras. Após incubação (cerca de 18 h, 4 °C), foi adicionado o segundo anticorpo conjugado a biotina (Clone B154.7 anti-TNF 1 µg/ml; Clone B27 anti-IL-10, 2,6 µg/ml.).

Após 1 h (T.a.), foi acrescentado o conjugado estreptoavidina-peroxidase (Sigma, 1:1000) e, em seguida (30 min, T.a.), a solução de substrato OPD (ortofenilenodiamina 5 mg/ml e peróxido de hidrogênio 30 Volumes 1:1000, em tampão citrato-fosfato pH 5,0). A reação foi finalizada com solução de H₂SO₄ 2 N e a densidade óptica foi obtida em um leitor de microplacas (Multskam, Thermo Labsystems, Taunton, MA, EUA.) com filtros de 492 nm e referência 620 nm. A concentração das citocinas foi determinada de acordo com as curvas padrões preparadas com cada citocina recombinante (R&D System, Mineápolis, MN, EUA), com o limite de detecção de 15 pg/ml (IL-10) e 50 pg/ml (TNF). Todos os hibridomas utilizados para obtenção dos anticorpos monoclonais utilizados foram gentilmente doados pelo Dr. Giorgio Trinchieri.

2.6 Citometria de Fluxo: As CMN (1,5 x 10⁶/poço) foram cultivadas na ausência ou presença de IFN γ (10 ng/ml; Peprotech), por 24 h. Em seguida, as células foram infectadas com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* (3 x 10⁵/poço) por adicionais 24 h (36 °C, 5% CO₂). Após este período, as células foram incubadas na ausência ou presença de 10 μ l de anticorpo monoclonal anti-TLR4 (Anti-humano CD284, Alexa Fluor 488, Clone HTA 125, eBioscience, San Diego, CA, EUA) por 15 min, T.a. Após, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 1%. Para a marcação intracelular, primeiramente as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 15 min, sendo em seguida permeabilizadas com solução de saponina a 0,3% e incubadas na ausência ou presença de 10 μ l de anti-TLR4 por 30 min, T.a. Após este período, as células foram ressuspensas em solução de paraformaldeído 1%. A aquisição foi realizada em citômetro ACCURI C6 (BD). Foram adquiridos 10.000 eventos da população de monócitos, identificada por FSC x SSC. A análise dos dados foi realizada pelo programa FSC versão 4 (DNS, Los Angeles, CA, EUA).

2.7 Análises estatísticas: Os dados são apresentados como mediana e valores mínimo e máximo (mediana [valor mínimo - valor máximo]), sendo avaliados pelo teste de Wilcoxon, usando GraphPad Prism versão 5 (San Diego, CA, EUA). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$

3. Resultados

3.1 Formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* induzem produção de TNF e IL-10 em células mononucleares pré-tratadas com interferon gama

Inicialmente, foi avaliada a capacidade de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* em induzir TNF em culturas de CMN. Para isto, as CMN de doadores sadios foram cultivadas na ausência ou na presença de $\text{INF}\gamma$ (24 h), sendo em seguida co-cultivadas com formas amastigotas de *L.(V.) braziliensis*. Como observado na Figura 1A, o co-cultivo das CMN com as formas amastigotas induziu um aumento estatisticamente significativo na produção de TNF ($\text{INF}\gamma$: 100,0 [100,0 – 267,0] pg/ml vs $\text{INF}\gamma$ + amastigotas 196,0 [100,0 – 1.085,0] pg/ml, $n = 13$, $p < 0,05$). Como mostrado na Figura 1B, a IL-10 também foi induzida pelas formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* nas CMN pré-tratadas com $\text{INF}\gamma$, porém em baixas quantidades ($\text{INF}\gamma$: 15,0 [15,0 – 51,6] pg/ml, $n = 7$; $\text{INF}\gamma$ + amastigotas: 29,5 [15,0 – 121,4] pg/ml, $n = 10$, $p < 0,05$). Quando as células foram cultivadas com as formas amastigotas na ausência de $\text{INF}\gamma$, as quantidades de TNF e de IL-10 ficaram abaixo do limiar de detecção do ensaio (dados não mostrados).

3.2 A produção de TNF e IL-10 induzidas por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* é dependente de TLR4

Para determinar se a produção de TNF e IL-10 induzida por *L. (V.) braziliensis* seria mediada por sinalização via TLR4, as CMN sensibilizadas com $\text{INF}\gamma$ foram tratadas ou não com anticorpos neutralizantes de TLR4, sendo em seguida, cultivadas com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Como mostrado na Figura 2A, a produção de TNF induzida pelas formas amastigotas foi significativamente reduzida na presença de anti-TLR4 ($\text{INF}\gamma$ + amastigotas: 281,0 [81,0 – 993,0] pg/ml; $\text{INF}\gamma$ + anti-TLR4 + amastigotas: 58,0 [50,0 – 100,0] pg/ml, $n = 6$; $p < 0,05$). A produção de IL-10 também foi reduzida nas culturas pré-tratadas com anti-TLR4 ($\text{INF}\gamma$ + amastigotas: 42,6 [30,7 – 121,0] pg/ml; $\text{INF}\gamma$ + anti-TLR4 + amastigotas: 17,0 [15,0 – 30,0] pg/ml, $n = 6$, $p < 0,05$; Fig. 2B). O LPS, agonista de TLR4, foi usado como controle para a indução de TNF e IL-10 e avaliação da neutralização de TLR4. O tratamento das CMN com anti-TLR4 bloqueou a indução de citocinas induzidas pelo LPS (TNF: $\text{INF}\gamma$ + LPS = 1.137,0 [599,0 – 2.310,0]; $\text{INF}\gamma$ + anti-TLR4 + LPS: 203,0 [49,0 - 470,0] pg/ml, $n = 6$, $p < 0,05$, Fig 2A).

IL-10: IFN γ + LPS = 99,8 [60,2 – 283,0]; IFN γ + anti-TLR4 + LPS: 22,2 [15,0 - 30,1] pg/ml, n = 4, p < 0,05; Fig 2B). Foi observado que a ativação com LPS induz maiores quantidades de citocinas do que as formas amastigotas (p < 0,05; Fig. 2A, 2B).

3.3 Agonista de TLR4 aumenta a produção de TNF induzida por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, mas não altera a produção de IL-10

A ativação das CMN com LPS induziu uma maior produção de citocinas do que a ativação com formas amastigotas, portanto, foi investigado se a adição de LPS às co-culturas de CMN com as formas amastigotas causaria um adicional aumento na produção de citocinas. Como observado na Figura 3A, a ativação das CMN com LPS, induziu um significativo aumento da produção de TNF nas células pré-tratadas com IFN γ (IFN γ : 100,0 [100,0 – 129,0] pg/ml vs LPS + IFN γ : 604,0 [310,0 - 1.453,0] pg/ml, p < 0,05, Fig. 3A). Um adicional aumento da produção de TNF nas culturas de CMN pré-tratadas com IFN γ e incubadas com formas amastigotas foi alcançado com a adição de LPS (IFN γ + amastigotas: 196,0 [100,0 – 1.085,0] pg/ml; IFN γ + amastigotas + LPS: 1.199,0 [477,0 – 2.119,0] pg/ml, n = 13, p < 0,05. Fig. 3A, 3B).

Como observado na Figura 4, o LPS induziu a produção de IL-10 nas CMN tratadas com IFN γ (IFN γ : 15,0 [15,0 - 51,9] pg/ml vs IFN γ + LPS: 51,4 [21,4 – 283,0] pg/ml, mas não aumentou a produção de IL-10 induzida por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* (IFN γ + LPS: 51,6 [21,4 – 283,0] pg/ml vs IFN γ + LPS + amastigotas: 49,3 [26,0 – 321,3] pg/ml; p < 0,05; Fig. 4; n = 10).

3.4 Expressão de TLR4 é modulada pela infecção com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

Porque as formas amastigotas induziram TNF e IL-10 apenas nas culturas de CMN incubadas com IFN γ e de maneira dependente de TLR4, foi avaliado se o IFN γ induzia um aumento da expressão dos TLR4 nos monócitos/macrófagos e se as formas amastigotas poderiam modular a expressão dos TLR4. Para isso, as CMN foram cultivadas na ausência ou na presença de IFN γ por 24 h e adicionais 24 h na ausência ou

presença de formas amastigotas. Inicialmente, as CMN foram avaliadas de acordo com tamanho (FSC-H) e a granulosidade (SSC-H), delimitando-se a janela de linfócitos e monócitos/macrófagos, como pode ser observado na Figura 5A. Na população de linfócitos, uma baixa expressão de TLR4 foi observada, a qual não foi alterada pelo tratamento com IFN γ (Fig. 5A). Por outro lado, na população de monócitos/macrófagos, o tratamento com IFN γ aumentou significativamente a expressão dos TLR4 (Meio: 38,92 [19,4 - 50,9] % de células expressando TLR4; IFN γ : 74,6 [50,7 - 90,0] % células expressando TLR4; n = 6; p < 0,05; Fig 5B). Naqueles indivíduos em que houve maior expressão de TLR4 induzida por IFN γ (87,0 [80,0 - 90,0]% de células TLR4⁺), a infecção com formas amastigotas não alterou significativamente a expressão de TLR4, porém, nos indivíduos que responderam menos ao IFN γ (65,0 [50,7 - 68,4]% de células TLR4⁺), as formas amastigotas causaram uma redução do número de células expressando TLR4 (IFN γ : 65,2 [50,7 - 68,4]%; IFN γ + AMA: 39,2 [37,7 - 40,2]%; n = 3; p < 0,05; Fig. 5C). A Figura 5D mostra um experimento representativo da redução do número de células TLR4⁺ após cultura com formas amastigotas. Nas culturas em que a expressão do TLR4 foi reduzida pelas amastigotas, foi observado que aproximadamente 32.0% das células expressavam TLR4 intracelularmente (Fig 5E, F).

4. Discussão

No presente trabalho foi demonstrado, pela primeira vez, que formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* são capazes de induzir a produção de TNF e IL-10 em CMN humanas pré-tratadas com IFN γ de maneira dependente de TLR4. As CMN incubadas com as formas amastigotas produziram níveis muito baixos ou indetectáveis de citocinas tanto pro quanto anti-inflamatória, havendo necessidade de pre-sensibilização com IFN γ . Estudos tem demonstrado que o IFN γ é capaz de sensibilizar os monócitos e macrófagos, tanto humanos quanto murinos, para posterior acionamento por substâncias ativadoras. Foi mostrado que CMN do sangue periférico humano, sensibilizadas com IFN γ , produziram maiores quantidades de TNF e IL-10 quando estimuladas com LPS do que na ausência de IFN γ [23]. Heyes & Zoon [24] também mostraram o efeito sensibilizador do IFN γ em monócitos humanos, aumentando a produção de TNF induzida pelo LPS. Formas promastigotas de *L. donovani* ativam macrófagos murinos para a produção de NO somente quando as células são pré-tratadas com IFN γ por 18 horas [25]. Formas amastigotas de *L. major* também são capazes de ativar macrófagos murinos na presença de IFN γ , induzindo NO [26]. Por outro lado, Gallego et al. [27] mostraram que a forma promastigota de *L. (Viannia) panamensis* foi capaz de induzir a produção de TNF em células humanas derivadas do sangue periférico (relação parasitos:célula de 5:1), independente de sensibilização prévia com IFN γ . Neste mesmo estudo, a indução de TNF por formas amastigotas de *L. (V.) panamensis* foi também avaliada na infecção de macrófagos murinos, porém a relação parasito:célula foi de 25:1 a 100:1, o que pode justificar a indução de TNF na ausência de IFN γ , enquanto para baixas relações parasitos:célula, pode ser requerida a sensibilização das células para a indução de citocina. No presente trabalho, foi utilizada uma relação amastigotas:monócito de ~2,0:1 a 4:1. Portanto, monócitos e macrófagos em repouso respondem mais eficientemente a patógenos ou suas moléculas se estiverem pré-sensibilizados com IFN γ , como demonstrado no presente trabalho.

Neste estudo, as formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* induziram mais TNF do que IL-10 nas culturas de CMN. Poucos estudos avaliaram a ativação de células humanas com formas amastigotas de *Leishmania* sp. Entre eles, e de acordo com nossos

resultados, foi mostrado que a infecção de células humanas U937 com formas amastigotas de *L. major* foi capaz de induzir elevados níveis de TNF e baixas concentrações de IL-10 [27]. Antígenos de *L. (L.) amazonensis* induzem baixas concentrações de IL-10 em culturas de CMN de pacientes com LTA, sendo fontes de IL-10 os linfócitos T CD4⁺ e os monócitos, quando as culturas são incubadas por 72 h [28]. Srivastava et al. [29] estudaram frações antigênicas de amastigotas de *L. donovani* e mostraram que as frações com massa molecular 65 e 98 kDa, separadas ou em combinação, foram capazes de ativar CMN humanas, induzindo elevados níveis de IL-12 e IFN γ , porém baixos níveis de IL-10. Assim, a fraca de indução de IL-10 nos experimentos do presente estudo pode ser devida à baixa capacidade intrínseca de *Leishmania* sp em induzir IL-10 em células humanas *in vitro*.

Os nossos resultados demonstraram que as formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* induzem a produção de TNF e IL-10 em culturas de CMN de maneira dependente de TLR4. Não há trabalhos prévios considerando a participação de TLR4 na resposta de células humanas a formas promastigotas ou amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Em infecção com outra espécie do mesmo subgênero, foi mostrado que a indução de TNF em macrófagos murinos, deficientes em TLR4, estimuladas com formas amastigotas de *L. (V.) panamensis*, foi completamente abolida, mostrando que a via do TLR4 foi fundamental para a indução de TNF pelo parasito [19], como ocorreu no presente estudo. Estes são resultados mais próximos dos nossos, pois apesar de utilizarem macrófagos murinos, estes foram infectados com parasitos do subgênero *Viannia*, como no presente estudo. Em modelos murinos com outras espécies de *Leishmania*, os resultados tem mostrado que a utilização de TLRs por diferentes espécies pode levar a diferentes respostas. Kavosi et al. [30] demonstraram que o LPG de *L. major* é capaz de induzir NO em macrófagos murinos J774 A.1 de maneira dependente de TLR2 e independente de TLR4, evidenciando o TLR2 como um importante receptor para *L. major*. Diferente da infecção com *L. major*, a infecção com *L. (V.) braziliensis*, em camundongos deficientes em TLR2, gerou uma maior ativação de células dendríticas, com aumento da produção de IL-12, uma maior ativação de Th1 e maiores níveis de IFN γ , levando a uma maior resistência à infecção [17]. Tais resultados sugerem que o TLR2 pode ser prejudicial à resposta imune anti-*L. (V.) braziliensis*. O mesmo estudo evidenciou que outros TLRs devem estar envolvidos na ativação das células durante a infecção com *L. (V.) braziliensis*, uma vez que nas células deficientes em MyD88, a resposta à infecção por esta espécie foi comprometida, gerando baixos níveis de IL-12 e

altos níveis de IL-10, e no animal deficiente em MyD88, a infecção cursou com maiores lesões e maior carga parasitária do que nos controles. De acordo com nossos resultados, o TLR4 pode ser importante para a resposta a *L. (V.) braziliensis*. No presente estudo, não foram investigados quais são os antígenos das formas amastigotas que podem ser ligantes de TLR4. Recentemente, dois estudos avaliaram dois componentes de membrana das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, quanto sua capacidade de ativar as células e a participação de TLR2 e TLR4 no reconhecimento destes antígenos. Em um deles, mostrou que o LPG de *L. (V.) braziliensis* é capaz de induzir TNF, IL-1 β , IL-6 e NO em macrófagos peritoneais murinos. A indução de NO pelo LPG foi significativamente reduzida nas células deficientes em TLR4 em comparação com aquelas deficientes em TLR2, sendo a produção das citocinas parcialmente reduzida nas células deficientes em TLR2 e completamente abolida nas células deficientes em TLR4 [31]. O outro mostrou que o glicoinositolfosfolipídeos (GIPL) de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* induziu NO em macrófagos murinos selvagens e também nos macrófagos murinos deficientes em TLR2, porém a produção do NO foi reduzida nos macrófagos deficientes em TLR4. A indução de TNF pelo GIPL, neste modelo, foi também dependente de TLR4 [32]. Estas evidências, juntamente com nossos resultados indicam o TLR4 como um importante receptor de moléculas presentes em *L. (V.) braziliensis*. Se estas mesmas moléculas são os principais ligantes de TLR4 nas formas amastigotas merece posterior investigação.

Nossos resultados mostraram que as formas amastigotas são menos potentes em induzir a produção de citocinas do que o LPS. Assim, investigamos se a adição de LPS às culturas de CMN e amastigotas poderia aumentar a produção de citocinas. De fato, a adicional sinalização via TLR4 induzida pelo LPS aumentou a capacidade de produção de TNF das CMN incubadas com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Estes dados sugerem que parte dos TLR4 foram acionados pelas formas amastigotas, mas ainda há TLR4 para responder ao LPS e que esta ativação pode causar um aumento da resposta das CMN às amastigotas. Alternativamente, a via do TLR4 poderia sinergizar com as vias de outros receptores acionados pelas formas amastigotas. A associação de agonistas de TLR e antígenos de *Leishmania* tem sido utilizada em estudos de imunoterapia para leishmaniose experimental. A administração de um agonista sintético de TLR4 (ONO-4007), juntamente com antígeno de membrana de *L. (L.) amazonensis* em camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis*, provocou uma redução do tamanho das lesões, associada a uma maior produção de IFN γ e de IL-12 [33]. A combinação de agonistas de

TLR4 e TLR9, juntamente com uma vacina denominada de L110f, reduziu significativamente o tamanho das patas e a carga parasitária em camundongos infectados com *L. major*, por induzir nos animais uma forte resposta Th1 [15]. O uso de agonistas de TLR4 e TLR9 como adjuvantes na imunização de camundongos BALB/c com proteínas de *L. donovani* aumentou a produção de IgG2a e a produção de IFN γ , direcionando para uma resposta Th1 [16]. Das et al. [34] mostraram que dois fármacos utilizadas para o tratamento da leishmaniose, miltefosine e paromomicina, tem a capacidade de aumentar a expressão de TLR4, e sugerem que o mecanismo de ação das mesmas seja mediado pelo TLR4, uma vez que o bloqueio deste receptor, aboliu os efeitos dos fármacos, reduzindo a produção de TNF, NO e a capacidade microbicida dos macrófagos infectados com *L. donovani*. Nos nossos ensaios, a adição de LPS às culturas de CMN com amastigotas não alterou a produção de IL-10, sugerindo que na presença das formas amastigotas, a adicional ativação de TLR4 não aumentaria a produção de citocina anti-inflamatória. Juntos, estes dados indicam que a sinalização via TLR4 pode auxiliar na ativação de CMN humanas infectadas com *L. (V.) braziliensis*, ampliando a produção de citocina pro-inflamatória.

A necessidade de pré-ativação das CMN com IFN γ , nos experimentos do presente estudo, poderia estar relacionada ao aumento da expressão de TLR4 nos monócitos/macrófagos, portanto nós investigamos esta possibilidade. Os resultados mostraram que o tratamento de CMN com IFN γ aumentou a expressão de TLR4 nos monócitos, distinguindo um grupo de fracos e um de fortes respondedores ao IFN γ . O aumento da expressão de TLR4 em monócitos e macrófagos humanos tem sido associado ao efeito sensibilizador do IFN γ [35], o que parece estar de acordo com os nossos resultados. No presente trabalho, além de ser demonstrado que o IFN γ é necessário para aumentar a produção de citocinas, este também aumentou a expressão de TLR4. As formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* causaram uma diminuição da expressão dos TLR4, especialmente naquelas culturas de CMN em que o IFN γ não causou um forte aumento de TLR4. Estes dados sugerem que naquelas culturas que são fortemente ativadas pelo IFN γ , há uma resistência ao efeito modulador de TLR4 pelas amastigotas. No entanto, nas células que respondem menos ao IFN γ , as formas amastigotas diminuem a expressão de TLR4, o que pode ser um mecanismo de evasão da resposta imune pelo parasito. Ao contrário destes resultados, a infecção de macrófagos humanos, derivados de monócitos do sangue periférico, com formas promastigotas de *L. (V.) panamensis* induziu um aumento da expressão de TLR1,

TLR2, TLR3 e TLR4 [19]. Apesar de esta espécie pertencer ao mesmo subgênero daquela usada no presente estudo, as características intrínsecas de cada espécie e as diferentes formas evolutivas podem originar diferentes respostas. Enquanto no presente estudo foi utilizada a forma amastigota, Gallego et al. [19] utilizaram formas promastigotas, as quais podem originar diferentes respostas.

A redução da expressão de TLR4 nos nossos experimentos poderia ser causada pela internalização dos receptores durante a infecção. De fato, foi observada uma redução de ~50% da marcação de TLR4 na membrana citoplasmática dos monócitos após interação com as formas amastigotas. Pouco se conhece sobre o papel do TLR4 intracelular, no entanto, foi mostrado que após 60 - 120 minutos de ativação com LPS, estes receptores são internalizados [36]. Husebye et al. [37] sugeriram que uma proteína denominada Rab11 controla o tráfego dos TLR4 no retículo endoplasmático e nos fagossomos e que a supressão dessa molécula inibe a presença de TLR4 nos fagossomos. Nos compartimentos intracelulares, esses receptores podem continuar sendo funcionais, como mostrado por Shibata et al. [38], que mostraram que os receptores internalizados eram capazes de induzir citocinas como TNF e IL-6 e NO, em resposta a *E. coli*. Assim, nossos resultados mostram que o *L. (V.) braziliensis* é capaz de modular a expressão do TLR4 na membrana, provavelmente induzindo endocitose dessas moléculas. Tuon et al. [39] estudaram a expressão de TLR2 e TLR4 nas lesões de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis*. Estes autores detectaram uma elevada expressão de TLR2 em relação a TLR4 numa proporção de 44:1 e que a expressão de TLR4 nas lesões dos pacientes foi menor do que na pele sadia controle, o que pode sugerir um mecanismo de modulação pelas amastigotas, como mostrado no presente estudo. Futuros estudos podem determinar se essa modulação é favorável à infecção, inibindo a via de ativação celular por TLR4, ou se esta via continua ativa intracelularmente, induzindo a produção de citocinas para combater a infecção.

O presente estudo contribui para a compreensão da interação entre células humanas e formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, a qual é ainda muito pouco conhecida. Formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* utilizam TLR4 para indução de citocinas TNF e IL-10 e podem modular a expressão destes receptores em monócitos humanos. Conhecer a imunopatogenia de *L. (V.) braziliensis* pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a LTA, especialmente a causada por *L. (V.) braziliensis*, a espécie mais prevalente no Brasil.

FIGURA 1

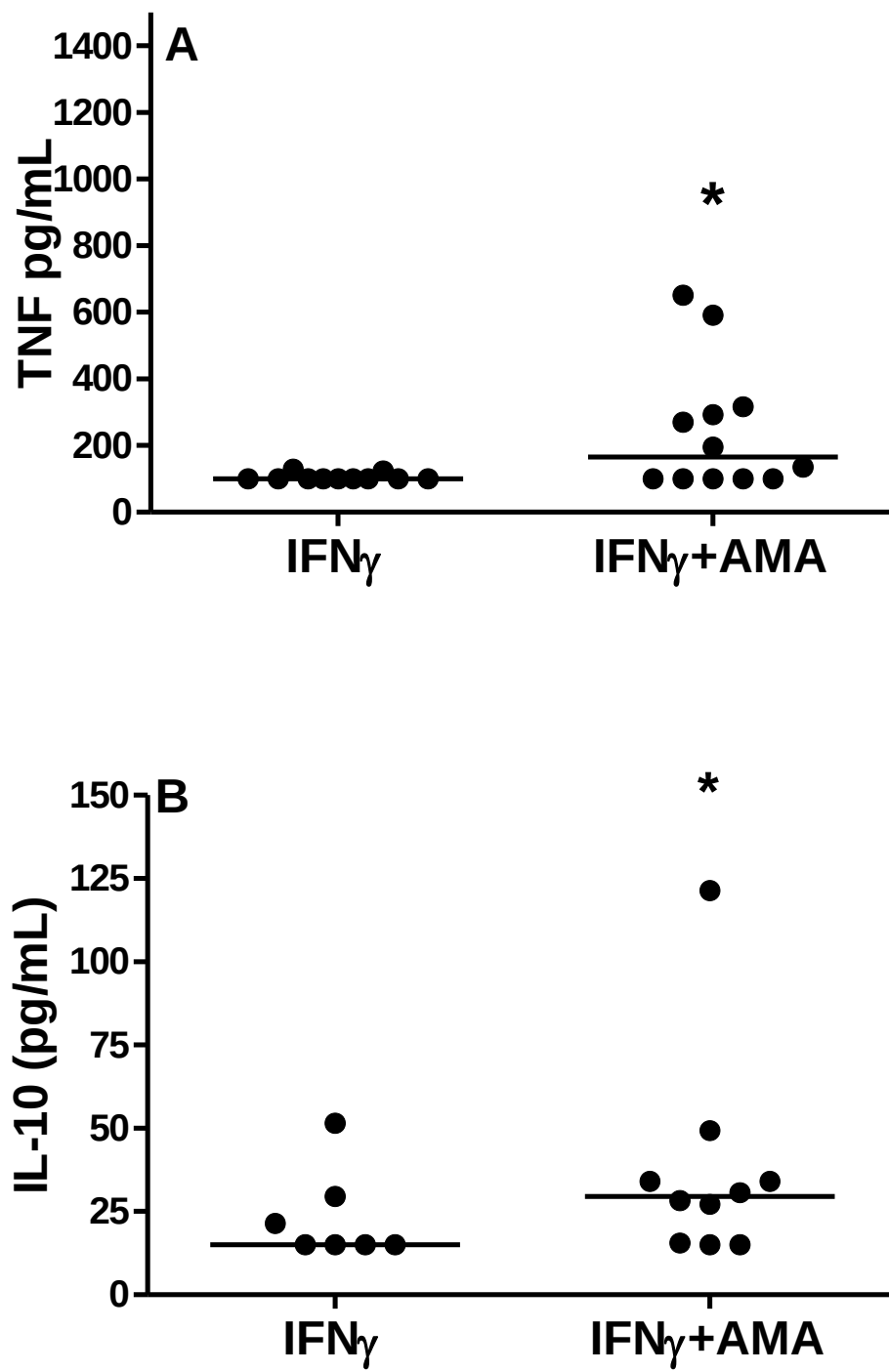


FIGURA 2

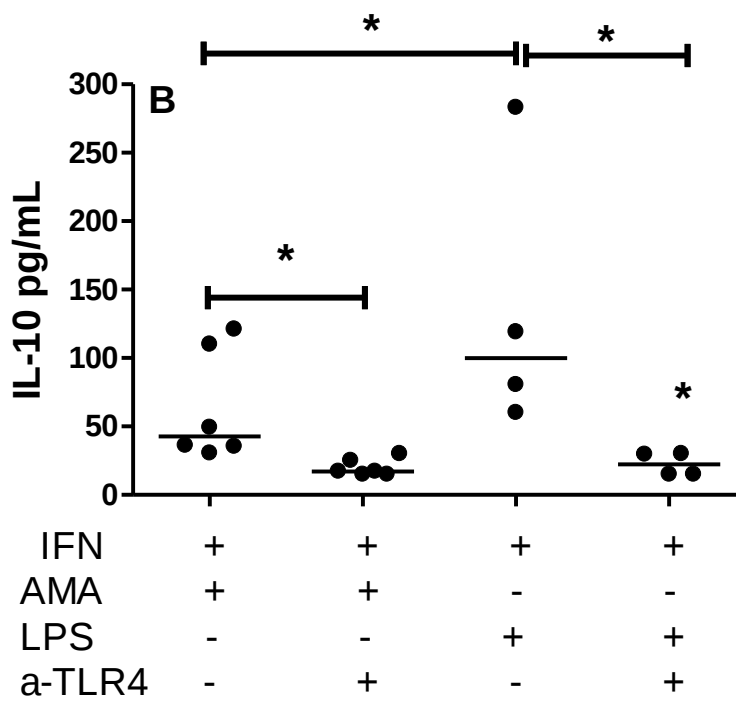
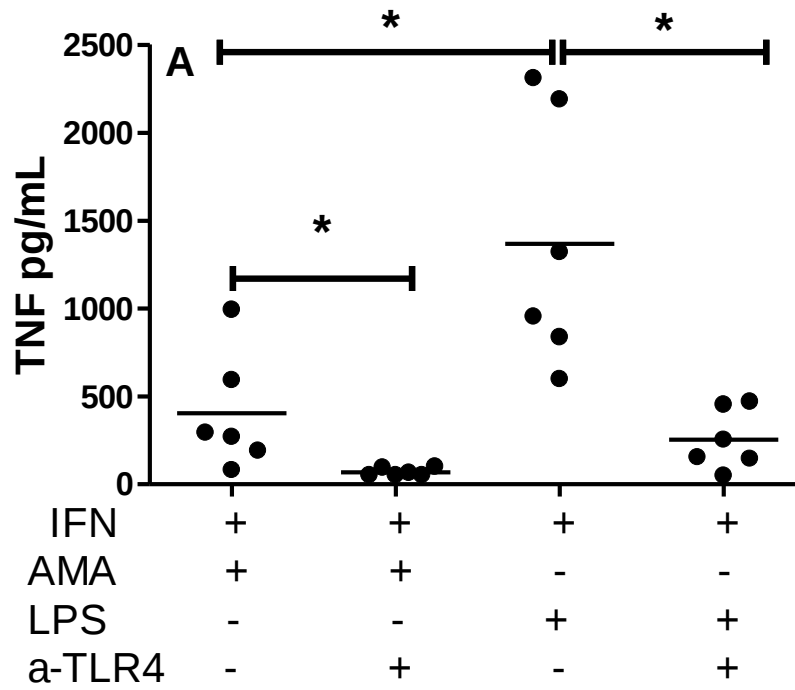


FIGURA 3

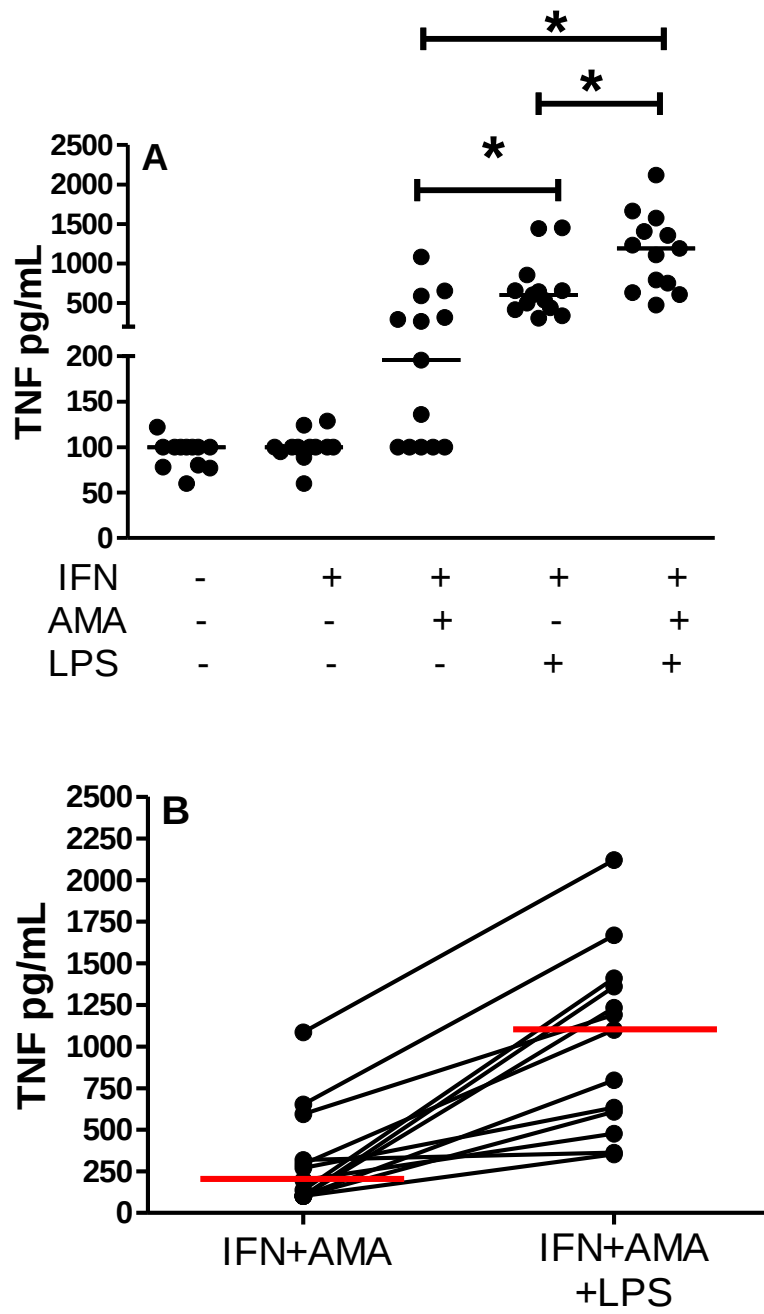


FIGURA 4

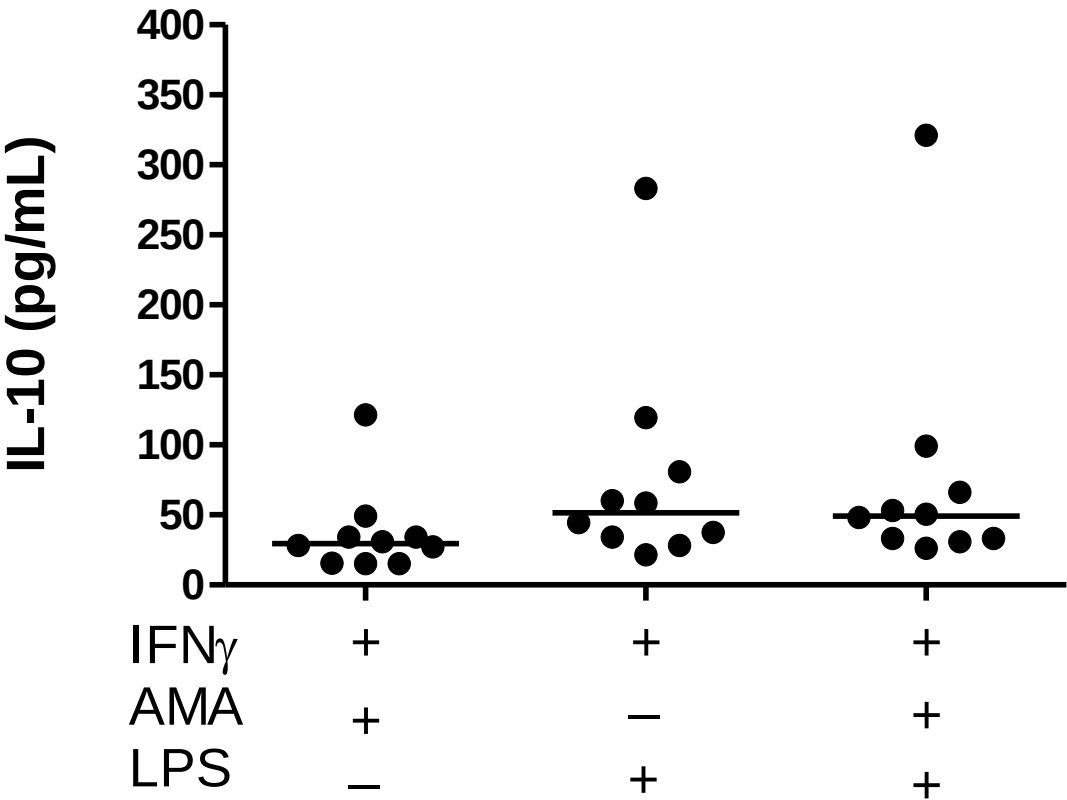
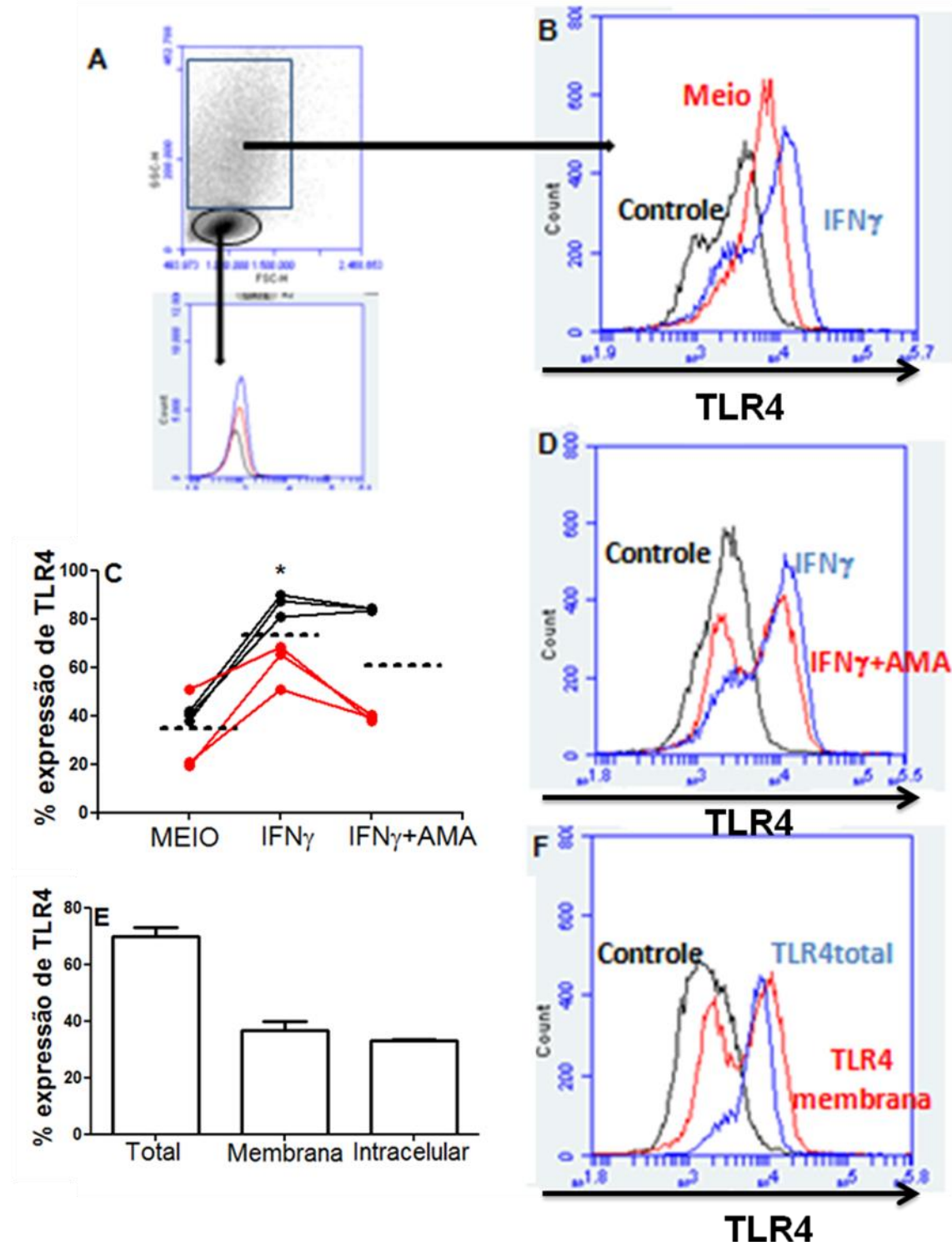


FIGURA 5



LISTA DE LEGENDAS

Figura 1. Formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* induzem a produção de TNF e IL-10 em células mononucleares humanas pré-tratadas com IFN γ . As CMN ($1,5 \times 10^6$ células/poço) foram incubadas por 24 h com IFN γ (INF, 100 U/ml), sendo em seguida, adicionadas as formas amastigotas (AMA, 3×10^5 parasitos/poço). Os sobrenadantes foram colhidos após 24 h de incubação e as concentrações de TNF e IL-10 foram mensuradas pelo método de ELISA. O limiar de detecção do TNF foi 100 pg/ml e da IL-10 15 pg/ml. São apresentados os valores individuais e as linhas horizontais são as medianas (em A, n = 13; em B, n = 7 e n = 10). *p < 0,05

Figura 2. Produção de TNF e IL-10 induzida por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* em células mononucleares humanas é dependente de TLR4. As CMN ($1,5 \times 10^6$ células/poço) foram incubadas com IFN γ (INF, 100 U/ml, 24 h) e, então, anticorpos anti-TLR4 (100 μ g/ml) foram adicionados 1 h antes da adição das formas amastigotas (AMA, 3×10^5 parasitos/poço) ou do agonista de TLR4, LPS (1 μ g/ml). As concentrações de TNF (A) e IL-10 (B) foram mensuradas por ELISA nos sobrenadantes das culturas após 24 h de incubação. Limiar de detecção de TNF: 50 pg/ml; de IL-10: 15 pg/ml. São representados os valores individuais e as medianas. *p < 0,05

Figura 3 - Agonista de TLR4 aumenta a produção de TNF induzida por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* em culturas de células mononucleares humanas pré-tratadas com IFN γ . As CMN ($1,5 \times 10^6$ células/poço) foram cultivadas ou não com IFN γ (INF, 100 U/ml) por 24 h. Em seguida, LPS (1 μ g/ml) e formas amastigotas (AMA, 3×10^5 parasitos/poço) foram adicionados e as culturas foram incubadas por adicionais 24 h. Os sobrenadantes foram colhidos e as concentrações de TNF foram mensuradas por ELISA. Em A, são apresentados os valores individuais e as medianas (n = 13). Em B, os valores individuais e as medianas dos tratamentos IFN+AMA e IFN+AMA+LPS (n = 13). *p < 0,05.

Figura 4. O LPS não altera a produção de IL-10 induzida por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* em células mononucleares humanas. As CMN ($1,5 \times 10^6$ células/poço) foram pré-tratadas com IFN γ (100 U/ml, 24 h) e incubadas ou não com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* (AMA, 3×10^5 parasitos/poço), na ausência ou na presença de LPS (1 μ g/ml). Após 24 h, os sobrenadantes foram colhidos e a concentração de IL-10 foi determinada por ELISA. O limite de detecção de IL-10 foi de 15 pg/ml. São apresentados os valores individuais e as medianas (n = 10).

Figura 5. Formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* diminuem a expressão de TLR4 na membrana citoplasmática de monócitos/macrófagos humanos. As CMN ($1,5 \times 10^6$) foram cultivadas na ausência (Meio) ou na presença de IFN γ por 24 h e após esse período foram incubadas com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* (AMA) por 24 h adicionais. A expressão de TLR4 foi avaliada por citometria de fluxo. Em A, seleção da janela dos monócitos/macrófagos (FCS-H x SSC-H). Em B, controle (células sem marcação, preto); Meio (vermelho) ou IFN γ (azul). Em C, valores individuais da % de células TLR4⁺ após tratamentos com IFN γ e IFN γ + AMA, destacam-se dois grupos: elevada (preto) ou moderada (vermelho) porcentagem de células TLR4⁺, sendo que cada linha representa um indivíduo e as linhas pontilhadas representam as medianas. Em D, histograma de um experimento representativo. E, avaliação da expressão de TLR4 em culturas tratadas com IFN γ e incubadas com formas amastigotas; Total representa a marcação intracelular e de membrana citoplasmática; Intracelular = % de células TLR4⁺ total - % de células TLR4⁺ na membrana citoplasmática. Em F, um experimento representativo.

REFERÊNCIAS

- [1] Gontijo B, de Carvalho ML. American cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36: 71-80.
- [2] Alvarl, J, Velez I D, Bern C, Hyerrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Den Boer1 M, The Who Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos One 2012; 7 (5): 1-12.
- [3] de Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. Front Immunol 2013; 3: 1-9.
- [4] Liese J, Schleicher U, Bogda C. The innate immune response against Leishmania parasites. Immunobiology 2008, 213: 377–387.
- [5] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol 2003; 21: 335-376.
- [6] Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B. Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. Proc Natl Acad Sci 2000; 97(5):2163-7.
- [7] Frey H, Schroeder N, Manon-Jensen T, Iozzo RV, Schaefer L. Biological interplay between proteoglycans and their innate immunoreceptors in inflammation. FEBS J 2013; 280 (10): 2165-2179.
- [8] Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. Front Immunol 2012; 3(79): 1-17.
- [9] de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, di Donato JA, Sexton AMC, Conville MJ, Handman E, Schofield L. Myd88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-Like Receptor 2 signaling. European Journal of Immunology 2003; 33: 2822-2831.
- [10] Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh Lg, Ruiz A, Cervantes R, Torres A, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A. Leishmania lipophosphoglycan (Lpg) activates NK cells through Toll-Like Receptor-2. Mol Biochem Parasitol 2003; 130 (2): 65-74.
- [11] Kavosi G, Ardestani SK, Kariminia A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). Parasitology 2009; 136: 1193–1199.
- [12] Guerra CS, Silva RM, Carvalho LO, Calabrese KS, Bozza PT, Côrte-Real S. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania amazonensis*. Int J Exp Pathol 2010; 91: 451–9.

- [13] Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Smith DF, Müller I. Toll-Like Receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania Major*. *Infect and Immun* 2004; 72(4): 1920-8.
- [14] Mukherjee AK, Gupta G, Adhikari A, Majumder S, Mahapatra SK, Majumdar SB, Majumdar S. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: role of TLR4 and TLR9. *International Immunopharmacology* 2012; 12: 565–572.
- [15] Raman VS, Bhatia A, Picone A, Whittle J, Bailor HR, Donnell JO, Patabhi S, Guderian JA, Mohamath R, Duthie MS, Reed SG. Applying TLR synergy in immunotherapy: implications in cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 2010; 185: 1701-1710.
- [16] Daifalla NS, Bayih AG, Gedamu L. Immunogenicity of *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase B1 and peroxidoxin 4 in Balb/c mice: the contribution of toll-like receptor agonists as adjuvant. *Experimental Parasitology* 2011; 129: 292–298.
- [17] Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L. Distinct Roles for MyD88 and Toll-Like Receptor 2 during *Leishmania braziliensis* Infection in Mice. *Infect Immun* 2009; 77 (7): 2948–2956.
- [18] Weinkopff T, Mariotto A, Simon G, La Torre YH, Auderset F, Schuster S, Zangger H, Fasel N, Barral A, Tacchini-Cottiera F. Role of Toll-Like Receptor 9 Signaling in Experimental *Leishmania braziliensis* Infection. *Infect and Immun* 2013; 81 (5): 1575–1584.
- [19] Gallego C, Golenbock D, Gomez MA, Saravia NG. Toll-Like Receptors participate in macrophage activation and intracellular control of *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Infect and Immun* 2011; 79 (7): 2871-9.
- [20] Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health* 2010; 15(1): 68-76.
- [21] Ahmed S, Colmenares M, Soong L, Goldsmith-Pestana K, Munstermann L, Molina R, McMahon-Pratt D. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 2003; 163: 401-410.
- [22] Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cell Microbiol* 2005; 7 (3): 383–392.
- [23] Hermann P, Rubio M, Nakajima T, Delespesse G, Sarfati M. CD80, and MHC class I expression release and selectively enhances IL-12p70, gram-negative bacteria-induced IL-10 differentially regulates gram-positive and IFN- α priming of human monocytes. *J Immunol* 1998; 161: 2011-2018.

[24] Hayes MP, Freeman SL, Raymond PD. IFN- γ priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. *Cytokine* 1995; 7 (5): 427–435.

[25] Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma primed macrophages. *Eur J Immunol* 2006; 36: 411–20.

[26] Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the l-arginine-dependent killing mechanism in ifn-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1990; 145: 4290-7.

[27] Guizani-Tabbane L, Ben-Aissa K, Belghith M, Sassi A, Dellagi K. *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. *Infect and Immun* 2004; 72: 2582-9.

[28] Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro De Jesus A, Dutra Wo, Gollob KJ, Carvalho E 2002. Up-Regulation of Th1type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect and Immun* 70: 6734-6740.

[29] Srivastava A, Singh N, Mishra M, Kumar V, Gour JK, Bajpai S, Singh S, Pandey HP, Singh RK. Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania donovani* amastigote-specific antigens. *Mol Cell Biochem* 2012; 359: 359–368.

[30] Kavosi G, Ardestani SK, Kariminia A, Alimohammadian MH. *Leishmania major* lipophosphoglycan: discrepancy in Toll-Like Receptor signaling. *Exp Parasitol* 2010; 124: 214–218.

[31] Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MM, Turco SJ, Soares RP. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasit Vectors* 2013; 6 (54): 1-11.

[32] Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(2): 1-11.

[33] Calvopina M, Barroso PA, Marco JA, Korenaga M, Cooper PJ. Efficacy of vaccination with a combination of leishmania amastigote antigens and the lipid analogue ONO-4007 for immunoprophylaxis and immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in a murine model of new world cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 2006; 24: 5645–5652.

[34] Das S, Rani M, Pandey K, Sahoo GC, Rabidas VN, Singh D, Das P. Combination of paromomycin and miltefosine promotes TLR4-dependent induction of antileishmanial immune response in vitro. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2373–2378.

- [35] Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, Martin MU, Mantovani A, Muzio M. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 2002; 99(9): 3427-31.
- [36] Kobayashi M, Saitoh S, Tanimura N, Takahashi K, Kawasaki K, Nishijima M, Fujimoto Y, Fukase K, Akashi-Takamura S, Miyake K. Regulatory Roles for MD-2 and TLR4 in Ligand-Induced Receptor Clustering. *J Immunol* 2006; 176:6211-6218.
- [37] Husebye H, Aune MH, Stenvik J, Samstad E, Skjeldal F, Halaas Ø, Nilsen NJ, Stenmark H, Latz H, Lien E, Mollnes TE, Bakke O, Espevik T. The Rab11a GTPase Controls Toll-like Receptor 4-Induced Activation of Interferon Regulatory Factor-3 on Phagosomes. *Immunity* 2010; 33: 583–596.
- [38] Shibata T, Motoi Y, Tanimura N, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K. Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages senses Gram-negative bacteria and induces a unique set of LPS-dependent genes. *Int. Immunol* 2011; 23 (8): 503–510.
- [39] Tuon FF, Fernandes ER, Duarte MI, Amato VS. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2012; 54(3):159-63.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, inicialmente foi investigada a expressão de IL-32 em lesões de pacientes com LTA, nas formas clínicas LC ou LM. Dos 35 pacientes do estudo, 24 (68,6%) eram positivos para presença de *Leishmania* nas lesões, sendo todos pertencentes ao subgênero *L. (Viannia)*. Considerando separadamente cada forma clínica, 78,2% (18/23) das amostras provenientes de lesões cutâneas e 50% (6/12) provenientes de lesões mucosas foram positivas. Os resultados obtidos quanto ao subgênero identificado, estão de acordo com os dados descritos por nosso grupo. Oliveira et al. (2010) mostraram a prevalência de *L. (Viannia)* sp no Estado de Goiás (92,5% *L. (Viannia)* e 7,5% *L. (L.) amazonensis*). Resultado similar foi obtido por Carvalho et al. (2006), em outro estado da região Centro-Oeste, o Mato Grosso, em que de 68 casos confirmados de LTA, 64 (91,1%) eram de infecção causada por *L. (V.) braziliensis* e quatro (5,9%) de infecção causada por leishmanias do complexo *Leishmania*.

A identificação do parasito responsável pela infecção é essencial para o correto tratamento, inferência de prognóstico e medidas profiláticas. As manifestações clínicas da doença dependem tanto da espécie envolvida quanto da resposta imune do paciente, portanto, para entender a imunopatogenia da LTA, em suas diferentes formas clínicas é necessária a caracterização da espécie do parasito que causa a doença (Romero et al., 2009; Carvalho et al., 2006; Ampuero et al., 2009). No entanto, é muito difícil que todas as amostras de fragmentos das lesões de pacientes apresentem amplificação do DNA de *Leishmania*, de tal forma que é quase improvável que se saiba qual o subgênero ou espécie que causa a infecção em todos os pacientes de uma pesquisa. A PCR para região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania* vem sendo utilizada para diagnóstico de LC e os resultados mostram uma sensibilidade variando de 80,0 a 95,4% (Lopez et al. 1993; Pirmez et al. 1999; Rodrigues et al. 2002; Marques et al. 2006; Ampuero et al. 2009). Para LM, esta técnica mostra resultados de 68,6% - 71% de sensibilidade (Pirmez et al. 1999; Bacha et al. 2011). Os nossos resultados mostraram sensibilidade da PCR próxima ao que vem sendo encontrado para LC, porém uma menor sensibilidade na LM do que as anteriormente publicadas. As diferentes sensibilidades podem ser explicadas

por variações técnicas, como utilização de diferentes iniciadores, e também pode depender da prevalência de determinadas espécies no local de infecção. No presente estudo, a maioria das amostras foram identificadas como *L. (Viannia)* sp. Como os pacientes contraíram a infecção em diferentes estados das regiões Norte, Centro-Oeste e de um estado do Nordeste, não se pode excluir a possibilidade de que algum paciente possa estar infectado por parasitos pertencentes ao subgênero *Leishmania*.

Desde a sua descoberta funcional, a IL-32 têm sido implicada em várias doenças auto-imunes e doenças inflamatórias crônicas, onde o altas concentrações de TNF estão envolvidas no processo patológico dessas doenças (Shioya et al. 2007; Joosten et al. 2006). Estudos apontam o envolvimento da IL-32 em doenças infecciosas de etiologia bacterianas e virais (Bai et al. 2011; Rasool et al. 2008). Já é conhecido que alguns patógenos tem a capacidade de induzir a produção da IL-32 (Netea et al. 2006; Schenk et al. 2012), no entanto, até o momento, não havia estudos que avaliassem a participação da IL-32 na leishmaniose. A IL-32 pode ser induzida em células epiteliais após estimulação com IL-18, IL-1 β e IFN γ (Kim et al. 2005). Meyer et al. (2010) mostraram que queratinócitos humanos produzem IL-32 e Jeong et al. (2011) mostraram que a IL-32 é produzida pela mucosa nasal de pacientes com rinite alérgica e sua expressão está associada à produção de citocinas inflamatórias. Além disto, a IL-32 pode ser produzida por linfócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (Kim et al. 2005, Netea et al. 2006, Schenk et al. 2012). Essas evidências nos levaram a hipotetizar que a IL-32 pudesse ser produzida durante a LTA, especialmente na forma mucosa, onde altas concentrações de TNF atuam na geração da lesão tecidual. A IL-32 tanto poderia ser produzida pelo epitélio quanto pelas células mononucleares do infiltrado inflamatório em resposta a antígenos do parasito ou citocinas, gerando uma alça de amplificação de sua produção, o que poderia ser responsável pelo processo inflamatório crônico, que culmina na lesão tecidual. De fato, nossos dados mostraram que a IL-32 está expressa nas lesões de pacientes com LTA nas formas clínicas cutânea e mucosa. Em ambas as formas clínicas, a IL-32 foi expressa tanto no infiltrado inflamatório quanto no epitélio, sem significantes diferenças nos níveis de expressão ou no padrão de expressão da citocina.

Nas lesões dos pacientes com LTA, as células fontes de IL-32 foram células gigantes, células do endotélio vascular, monócitos, linfócitos, macrófagos e queratinócitos. Schenk et al. (2012) avaliaram a expressão da IL-32 nas lesões de pacientes com hanseníase e revelaram uma forte expressão desta citocina associada aos granulomas. Em tecido pulmonar de pacientes com infecção por micobactérias do

complexo *M. avium* (MAC) foi observado que a IL-32 foi produzida principalmente por células do epitélio respiratório, seguida por células alveolares tipo II e macrófagos alveolares, também estava presente nos granulomas (Bai et al. 2011). Os nossos resultados, mostrando a presença de IL-32 em células gigantes, somados a estes trabalhos que mostram a presença de IL-32 em granuloma, sugerem que a IL-32 pode estar envolvida na formação ou manutenção de granulomas epitelióides. Kobayashi et al. (2010) demonstraram a presença da IL-32 nas células do endotélio vascular, ressaltando a importância dessa citocina na propagação da inflamação via indução de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias, o que justifica a grande concentração dessa citocina no endotélio dos tecidos de pacientes com LTA. Outra célula em que encontramos grande concentração da IL-32 foram os queratinócitos. Meyer et al. (2010) mostraram que os queratinócitos são fonte de IL-32 após estimulação com IFN γ e TNF. Assim, justifica-se o nosso resultado uma vez que nas biópsias dos pacientes também encontramos altos níveis de TNF. Na hepatite C, a IL-32 foi encontrada nos hepatócitos, em células do infiltrado inflamatório, porém não estava presente nas células de Kupffer (Moschen et al. 2011).

Nós avaliamos a expressão de quatro isoformas da IL-32 ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) nas lesões dos pacientes com LTA, por meio da PCR em tempo real e encontramos apenas a isoforma IL-32 γ . Os dados apontam que somente a isoforma gama é produzida durante a infecção por *L. (Viannia)* e talvez por *L. (L.) amazonensis*. Vários estudos buscaram identificar as propriedades biológicas de cada isoforma de IL-32, como por exemplo, Choi et al. (2009) avaliaram a capacidade das isoformas na indução de citocinas e mostraram que a isoforma γ foi a mais ativa, induzindo diferentes citocinas em células mononucleares humanas e em macrófagos murinos. Bae et al. (2012) demonstraram um importante papel para a IL-32 γ na proteção contra infecção por vírus, uma vez que o sobrenadante de células THP1 tratadas com IL-32 γ recombinante foi capaz de induzir uma molécula denominada transferrina, que exerceu atividade anti-viral. Os mesmos autores encontraram altos níveis de IL-32 no soro de pacientes com infecção pelo H1N1 e em modelo experimental demonstraram que a isoforma IL-32 γ foi a única isoforma secretada. Heinhuis et al. (2011) mostraram que a IL-32 γ é a isoforma mais potente na indução de mediadores pró-inflamatórios como o TNF, IL-1 e IL-6 e podem contribuir para a gravidade da artrite reumatóide. Assim, parece que durante infecções e processos inflamatórios a IL-32 γ seria a isoforma mais prevalente e ativa.

Apesar de esperarmos que a maior expressão da IL-32 estivesse presente nas lesões de pacientes com a forma mucosa, devido à mais elevada produção de TNF descrita em lesões mucosas em alguns artigos (Amato et al. 2003), não foi encontrada diferença no padrão ou nos níveis de expressão da IL-32 em relação à forma clínica, nem IL-32 proteína nem mRNA IL-32. Schenk et al. (2012) verificaram uma maior expressão da IL-32 na forma tuberculóide da hanseníse do que na forma lepromatóide. Neste estudo, os autores descreveram um importante papel para a IL-32 na indução da maturação de células dendríticas (aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias, e aumento da expressão de moléculas de MHC I e II) que seria responsável pela ativação de uma resposta imune eficiente e assim desenvolvendo a forma clínica mais branda da doença. Na LTA, a presença da IL-32 pode favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune Th1, necessária para o controle da infecção tanto na LC quanto na LM. Moschen et al. 2011 associaram a expressão da IL-32 à gravidade da hepatite C, onde a IL-32 foi encontrada nas biópsias de pacientes com cirrose, fibrose e esteatose, resultado similar foi encontrado por Xu et al. (2012) ao avaliar biópsias de pacientes com hepatite B.

Uma vez que detectamos a IL-32 nas lesões de paciente com LTA, que a maioria dos pacientes estavam infectados por *L. (Viannia) sp*, buscamos identificar se formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* induziriam a expressão da citocina em células mononucleares humanas. Os resultados mostraram um aumento de 3x na expressão da isoforma γ da IL-32, em células mononucleares incubadas com os parasitos por 24 h. As demais isoformas não foram detectadas. Este resultado está de acordo com a expressão da IL-32 nas lesões dos pacientes, uma vez que somente essa isoforma estava expressa nas lesões. No entanto, nossos resultados sugerem, pela forte expressão da IL-32 γ nas lesões dos pacientes com LTA, e pelos baixos níveis induzidos por *L. (V.) braziliensis*, que a grande quantidade da citocina encontrada nos tecidos pode ser principalmente induzida pelo processo inflamatório do que diretamente pelo parasito. Assim, nós mostramos pela primeira vez a indução da expressão da IL-32 por um protozoário. Recentemente, Schenk et al. (2012) mostraram que o *M. lepreae* foi capaz de induzir níveis semelhantes aos nossos em células humanas e foi dependente da quantidade do patógeno. Aqui nós não avaliamos se uma quantidade maior de parasitos induziria uma maior expressão da IL-32. Netea et al. (2006) foram os primeiros a mostrar que alguns microrganismos induziam a expressão de IL-32. Os autores mostraram que *M. tuberculosis*, *M. bovis* e o BCG induzem elevada produção de IL-32 (β e γ) em monócitos humanos, de maneira

dependente de IFN γ . Os autores ainda mostraram que outros patógenos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* não induzem IL-32 em células mononucleares humanas ou monócitos.

Além das micobacterias descritas acima, *M. avium* induziu a expressão da IL-32 α em células do epitélio brônquico (BEAS). Estudos tem demonstrado a indução da IL-32 por vírus HIV, Influenza e pelos vírus da hepatite B e C (Rasool et al. 2008; Li et al. 2008; Xu et al. 2012; Moschen et al. 2011). A indução de IL-32 pela amastigota de *L. braziliensis*, somente foi encontrada nas células pré-tratadas com IFN γ . Assim, a resposta Th1 teria um importante papel para a promoção da indução dessa citocina na LTA. Os PAMPs dos microrganismos podem sinalizar via TLR e induzir a expressão da IL-32, como mostrado por Alsaleh et al. (2010) que detectaram a expressão de IL-32 em fibroblastos pré-tratados com IFN γ e estimulados ligantes de TLR 2, 3 e 4.

Além dos altos níveis de IL-32 nos tecidos encontramos também um aumento na expressão de TNF e IL-10. A relação da IL-32 com o aumento de TNF está bem evidenciada na literatura, uma vez que a sua função biológica inicialmente descrita foi a de ser uma citocina indutora de TNF (Kim et al. 2005) e vem sendo demonstrada em modelos de doenças inflamatórias onde o TNF é importante, como na artrite reumatóide (Joosten et al. 2005) e na doença inflamatória intestinal (Shioya et al. 2007). A relação entre essas duas citocinas é também evidenciada pela capacidade do TNF em aumentar a expressão da IL-32, o que por sua vez prolonga a produção do TNF numa alça de retroalimentação positiva (Heinhuis et al. 2011). Em um estudo utilizando células do endotélio vascular, os autores mostraram que o TNF induz IL-32 e esta por sua vez aumenta a expressão de moléculas de adesão, favorecendo assim a propagação do processo inflamatório (Kobayashi et al. 2010). Apesar de termos encontrado níveis semelhantes de IL-32 γ nas lesões cutâneas e mucosas, a quantidade de TNF encontrada nas lesões mucosa foi cerca de 4.000 vezes maior que nas lesões de cutânea, sugerindo que neste microambiente a IL-32 talvez possa estar contribuindo para a indução de TNF, assim como nas lesões cutâneas, porém de forma desregulada nas lesões mucosas. Isto porque, ao avaliarmos a expressão de IL-10, encontramos que tanto pela imunistoquímica quanto pela PCR em tempo real não houve diferença entre os níveis de expressão desta citocina nas formas clínicas LC e LM. Assim, a grande quantidade de TNF nas lesões mucosas, não é devido à falta de IL-10, mas provavelmente se deva a uma falta de resposta à IL-10. Faria et al. (2005) encontraram similares quantidades de

IL-10 nas lesões de pacientes com LTA cutânea e mucosa, no entanto, mostraram que nas lesões dos pacientes com LM a expressão do receptor para a IL-10 estava menor do que na LC, justificando o maior descontrole do processo inflamatório nos pacientes com lesões mucosa.

Alguns trabalhos tem mostrado que a IL-32 pode também induzir a IL-10, Kang et al. (2009) mostraram que IL-32 β induz a expressão de IL-10 em células K-562 e células U937, que por sua vez regula a produção de outras citocinas inflamatórias, sugerindo um mecanismo de retro-alimentação negativa. Heinhuis et al. (2011) demonstraram que durante a edição do RNA mensageiro da isoforma IL-32 γ pode haver um processamento alternativo levando à expressão de IL-32 β , que por sua vez poderia controlar os efeitos pró-inflamatórios da IL-32 γ . No nosso estudo, não encontramos, pela técnica de PCR, a expressão desta isoforma da IL-32, bem como não encontramos correlação entre a expressão de IL-10 e IL-32 quantificadas nas reações de imunoistoquímica e PCR em tempo real. Choi et al. (2010) geraram um camundongo transgênico expressando IL-32 γ que, após terem uma colite induzida, apresentaram uma reação inflamatória aguda mais grave do que os controles. No entanto, seis dias após a indução da colite, os camundongos transgênicos exibiram reduzida inflamação do cólon e maior taxa de sobrevivência, baixos níveis de TNF em comparação com os controles, quando foi demonstrado que a IL-10 estava aumentada nos camundongos expressando IL-32. Assim, a maior expressão da IL-32 nas lesões de LTA poderia contribuir tanto com a produção de TNF ou de IL-10, podendo ser importante tanto para a eliminação dos parasitos, ou para o controle do processo inflamatório, ou ainda favorecer a lesão tecidual.

Paralelo a esses achados, encontramos que a amastigota de *L. (V.) braziliensis* foi capaz de induzir TNF e IL-10 em CMN tratadas com IFN γ . Assim, o TNF induzido pela amastigota poderia estimular a indução da IL-32, numa alça de retroalimentação positiva. A dependência da sensibilização com o IFN γ para a ativação celular tem sido mostrada por diversos estudos utilizando células humanas ou murinas. Hermann et al. (1998) mostraram que CMN do sangue periférico humano, sensibilizadas com IFN γ , produziram maiores quantidades de TNF e IL-10 quando estimuladas com LPS do que na ausência de IFN γ . Heyes et al. (1995) também mostraram o efeito sensibilizador do IFN γ em monócitos humanos, aumentando a produção de TNF induzida pelo LPS. Fladin et al. (2006) mostraram que formas promastigotas de *L. donovani* ativaram IRAK-1 em

macrófagos murinos somente quando as células foram pré-tratadas com IFN γ por 18 horas, assim como a produção de NO e TNF induzida pelo parasito foi dependente do efeito sensibilizador do IFN γ . Green et al. (1990) observaram que formas amastigotas de *L. major* também são capazes de ativar macrófagos murinos na presença de IFN γ , induzindo NO. A sensibilização com IFN γ pode aumentar a expressão de TLR, assim aumentando a resposta da célula a uma subsequente estimulação, como demonstrado por Flandin et al. (2006) em macrófagos murinos (aumento da expressão de TLR3). Também Bosisio et al. (2002) mostraram que TLR4 está aumentado após sensibilização de CMN com IFN γ .

Poucos estudos avaliaram a ativação de células humanas com formas amastigotas de *Leishmania* sp. Entre eles, Guizani-Tabbane et al. (2004) mostraram que a infecção de células humanas U937, diferenciadas com éster de forbol miristato (PMA) com formas amastigotas de *L. major* foi capaz de induzir altos níveis de TNF e baixas concentrações de IL-10, sendo que esta indução foi dependente da ativação do fator de transcrição NF κ B. Nosso estudo mostrou que formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* induzem TNF e IL-10 em CMN sensibilizadas com IFN γ . Gallego et al. (2011) mostraram que na forma promastigota a *L. (Viannia) panamensis* foi capaz de induzir a produção de TNF em macrófagos derivados de monócitos humanos, independente de sensibilização com IFN γ . Apesar de utilizarem também parasitos do subgênero *Viannia*, os autores mostraram que a melhor relação parasito-célula para a indução de TNF foi de 5: 1. Os autores também mostraram a indução de TNF por formas amastigota de *L.(V.) panamensis* na infecção de macrófagos murinos, porém a relação parasito célula foi de 25 a 100, o que poderia justificar a indução da citocina na ausência de IFN γ . A utilização de baixa relação parasitos:células pode requerer a sensibilização das células com IFN γ para a indução de citocinas por formas amastigotas de *L. (Viannia) braziliensis*.

Outros trabalhos avaliaram a indução de citocinas por antígenos de leishmânia e mostraram baixas quantidades de IL-10 produzidas, como visto no presente trabalho. Antígenos de *L.(L.) amazonensis* induziram baixas concentrações de IL-10 em culturas de CMN de pacientes com LTA, sendo fontes de IL-10 os linfócitos T CD4⁺ e os monócitos, quando as culturas foram incubadas por 72 h (Bacellar et al. 2002). Srivastava et al. (2012) estudaram frações antigênicas de formas amastigotas de *L. donovani* e mostraram que as frações com massa molecular de 65 e de 98 kDa, separadas ou em combinação, foram capazes de ativar CMN humanas após 72 h de cultura, induzindo

altos níveis de IL-12 e IFN γ , porém baixos níveis de IL-10. Portanto, a fraca indução de IL-10 nos experimentos do presente estudo pode ser devido à baixa capacidade intrínseca de *Leishmania* sp em induzir IL-10 em células humanas *in vitro*, bem como ao tempo de infecção, que em nosso estudo foi de 24 h, sendo portanto, provavelmente, os monócitos a principal fonte da citocina.

Os nossos resultados demonstraram que as formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* induzem a produção de TNF e IL-10 em culturas de CMN de maneira dependente de TLR4. Não há trabalhos prévios considerando a participação de TLR4 na resposta de células humanas a formas promastigotas ou amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Em infecção com outra espécie do mesmo subgênero, foi mostrado que a indução de TNF em células U937, diferenciadas com PMA, deficientes em TLR4, estimuladas com formas amastigotas de *L. (V.) panamensis*, foi completamente abolida, mostrando que a via do TLR4 foi fundamental para a indução de TNF pelo parasito (Gallego et al., 2011), como ocorreu no presente estudo. Estes são resultados mais próximos dos nossos, pois apesar de utilizarem macrófagos murinos, estes foram infectados com parasitos do subgênero *Viannia*, como no presente estudo. Em modelos murinos com outras espécies de *Leishmania*, os resultados tem mostrado que a utilização de TLRs por diferentes espécies pode levar a diferentes respostas. Kavoosi et al.(2010) demonstraram que o LPG de *L. major* é capaz de induzir NO em macrófagos murinos J774 A.1 de maneira dependente de TLR2 e independente de TLR4, evidenciando o TLR2 como um importante receptor para *L. major*. Diferente da infecção com *L. major*, a infecção com *L. (V.) braziliensis*, em camundongos deficientes em TLR2, gerou uma maior ativação de células dendríticas, com aumento da produção de IL-12, uma maior ativação de Th1 e maiores níveis de IFN γ , levando a uma maior resistência à infecção (Vargas-Inchaustegui et al., 2009). Tais resultados sugerem que o TLR2 pode ser prejudicial à resposta imune anti-*L. (V.) braziliensis*. O mesmo estudo evidenciou que outros TLRs devem estar envolvidos na ativação das células durante a infecção com *L. (V.) braziliensis*, uma vez que nas células deficientes em MyD88, a resposta à infecção por esta espécie foi comprometida, gerando baixos níveis de IL-12 e altos níveis de IL-10, e no animal deficiente em MyD88, a infecção cursou com maiores lesões e maior carga parasitária do que nos controles. De acordo com nossos resultados, o TLR4 pode ser importante para a resposta a *L. (V.) braziliensis*. No presente estudo, não foram investigados quais são os antígenos das formas amastigotas que podem ser ligantes de TLR4. Recentemente, dois estudos avaliaram dois componentes de membrana das formas

promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, quanto sua capacidade de ativar as células e a participação de TLR2 e TLR4 no reconhecimento destes antígenos. Um deles mostrou que o LPG de *L. (V.) braziliensis* é capaz de induzir TNF, IL-1 β , IL-6 e NO em macrófagos peritoneais murinos. A indução de NO pelo LPG foi significativamente reduzida nas células deficientes em TLR4 em comparação com aquelas deficientes em TLR2, sendo a produção das citocinas parcialmente reduzida nas células deficientes em TLR2 e completamente abolida nas células deficientes em TLR4 (Ibrahim et al., 2013). O outro mostrou que o glicoinositolfosfolipídeos (GIPL) de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* induziu NO em macrófagos murinos selvagens e também nos macrófagos murinos deficientes em TLR2, porém a produção do NO foi reduzida nos macrófagos deficientes em TLR4. A indução de TNF pelo GIPL, neste modelo, foi também dependente de TLR4 (Assis et al., 2013). Estas evidências, juntamente com nossos resultados indicam o TLR4 como um importante receptor de moléculas presentes em *L. (V.) braziliensis*. Se estas mesmas moléculas são os principais ligantes de TLR4 nas formas amastigotas merece posterior investigação.

Nossos resultados mostraram que as formas amastigotas são menos potentes em induzir a produção de citocinas do que o LPS. Assim, investigamos se a adição de LPS às culturas de CMN e amastigotas poderia aumentar a produção de citocinas. De fato, a adicional sinalização via TLR4 induzida pelo LPS aumentou a capacidade de produção de TNF das CMN incubadas com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Estes dados sugerem que parte dos TLR4 foram acionados pelas formas amastigotas, mas ainda há TLR4 para responder ao LPS e que esta ativação pode causar um aumento da resposta das CMN às amastigotas. Alternativamente, a via do TLR4 poderia sinergizar com as vias de outros receptores acionados pelas formas amastigotas. A associação de agonistas de TLR e antígenos de *Leishmania* tem sido utilizada em estudos de imunoterapia para leishmaniose experimental. A administração de um agonista sintético de TLR4 (ONO-4007), juntamente com antígeno de membrana de *L. (L.) amazonensis* em camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis*, provocou uma redução do tamanho das lesões, associada a uma maior produção de IFN γ e de IL-12 (Calvopina et al., 2006). A combinação de agonistas de TLR4 e TLR9, juntamente com uma vacina denominada de L110f, reduziu significativamente o tamanho das patas e a carga parasitária em camundongos infectados com *L. major*, por induzir nos animais uma forte resposta Th1 (Raman et al., 2010). Das et al. (2012) mostraram que dois fármacos utilizadas para o tratamento da leishmaniose, miltefosine e paromomicina, tem a capacidade de aumentar a

expressão de TLR4, e sugerem que o mecanismo de ação das mesmas seja mediado pelo TLR4, uma vez que o bloqueio deste receptor, aboliu os efeitos dos fármacos, reduzindo a produção de TNF, NO e a capacidade microbicida dos macrófagos infectados com *L. donovani*. Nos nossos ensaios, a adição de LPS às culturas de CMN com amastigotas não alterou a produção de IL-10, sugerindo que na presença das formas amastigotas, a adicional ativação de TLR4 não aumentaria a produção de citocina anti-inflamatória. Juntos, estes dados indicam que a sinalização via TLR4 pode auxiliar na ativação de CMN humanas infectadas com *L. (V.) braziliensis*, ampliando a produção de citocina pro-inflamatória.

A necessidade de pré-ativação das CMN com IFN γ , nos experimentos do presente estudo, poderia estar relacionada ao aumento da expressão de TLR4 nos monócitos/macrófagos, portanto nós investigamos esta possibilidade. Os resultados mostraram que o tratamento de CMN com IFN γ aumentou a expressão de TLR4 nos monócitos, distinguindo um grupo de fracos e um de fortes respondedores ao IFN γ . O aumento da expressão de TLR4 em monócitos e macrófagos humanos tem sido associado ao efeito sensibilizador do IFN γ (Bosisio et al., 2002), o que parece estar de acordo com os nossos resultados. No presente trabalho, além de ser demonstrado que o IFN γ é necessário para aumentar a produção de citocinas, este também aumentou a expressão de TLR4. As formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* causaram uma diminuição da expressão dos TLR4, especialmente naquelas culturas de CMN em que o IFN γ não causou um forte aumento de TLR4. Estes dados sugerem que naquelas culturas que são fortemente ativadas pelo IFN γ , há uma resistência ao efeito modulador de TLR4 pelas amastigotas. No entanto, nas células que respondem menos ao IFN γ , as formas amastigotas diminuem a expressão de TLR4, o que pode ser um mecanismo de evasão da resposta imune pelo parasito. Ao contrário destes resultados, a infecção de macrófagos humanos, derivados de monócitos do sangue periférico, com formas promastigotas de *L. (V.) panamensis* induziu um aumento da expressão de TLR1, TLR2, TLR3 e TLR4 (Gallego et al., 2011). Apesar de esta espécie pertencer ao mesmo subgênero daquela usada no presente trabalho, as características intrínsecas de cada espécie e as diferentes formas evolutivas podem originar diferentes respostas. Enquanto no presente estudo foi utilizada a forma amastigota, Gallego et al. (2011) utilizaram formas promastigotas, as quais podem originar diferentes respostas. Murray et al. (2009), mostraram que a infecção com *L. donovani* induziu aumento a expressão de TLR2 e TLR4 no fígado de

camundongos. No entanto, mostraram que somente TLR4 foi indispensável para o controle da infecção, uma vez que os camundongos deficientes em TLR4 infectados com *L. donovani* tiveram menores níveis de IFN γ , TNF e NO, com retardo na formação do granuloma, e até mesmo menor resposta a quimioterapia, já o deficiente em TLR2 a infecção foi controlada.

A redução da expressão de TLR4 nos nossos experimentos poderia ser causada pela internalização dos receptores durante a infecção. De fato, foi observada uma redução de ~50% da marcação de TLR4 na membrana citoplasmática dos monócitos após interação com as formas amastigotas. Pouco se conhece sobre o papel do TLR4 intracelular, no entanto, foi mostrado que após 60 - 120 minutos de ativação com LPS, estes receptores são internalizados (Kobayashi et al. 2006). Husebye et al. (2010) sugeriram que uma proteína denominada Rab11 controla o tráfego dos TLR4 no retículo endoplasmático e nos fagossomos e que a supressão dessa molécula inibe a presença de TLR4 nos fagossomos. Nos compartimentos intracelulares, esses receptores podem continuar sendo funcionais, como mostrado por Shibata et al. (2011), que mostraram que os receptores internalizados eram capazes de induzir citocinas como TNF e IL-6 e NO, em resposta a *E. coli*. Assim, nossos resultados mostram que o *L. (V.) braziliensis* é capaz de modular a expressão do TLR4 na membrana, provavelmente induzindo endocitose dessas moléculas. Tuon et al. (2012) estudaram a expressão de TLR2 e TLR4 nas lesões de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis*. Estes autores detectaram uma elevada expressão de TLR2 em relação a TLR4 numa proporção de 44:1 e que a expressão de TLR4 nas lesões dos pacientes foi menor do que na pele sadia controle, o que pode sugerir um mecanismo de modulação pelas amastigotas, como mostrado no presente estudo. Futuros estudos podem determinar se essa modulação é favorável à infecção, inibindo a via de ativação celular por TLR4, ou se esta via continua ativa intracelularmente, induzindo a produção de citocinas para combater a infecção.

. Recentemente, o Pam₃Cys (agonista de TLR2) foi utilizado juntamente com o miltefosine para tratar camundongos infectados com *L. donovani*. A estimulação de TLR2 juntamente com a droga aumentou a eficácia da mesma, evidenciado por uma maior redução da carga parasitária e pelo aumento de IL-12, IFN γ e redução da produção de IL-10 (Shakya et al. 2012) mostrando a importância da ativação da imunidade inata na eficácia do tratamento pela droga. Jayakumar et al (2011) também evidenciaram um importante papel para TLR na proteção de camundongos infectados com *L. (V.) panamensis*. O Pam3CSK4, agonista de TLR2/1 foi utilizado como adjuvante na

vacinação com TRYP (vacina de DNA) induzindo altos níveis de IFN γ , granzima B, e baixas concentrações de IL-13 e IL-10, além de aumentar o número de células TCD4 e TBC8 específicas nos animais imunizados, levando a lesões menores e com baixa carga parasitária. Os dados acima, juntamente com dados do nosso grupo, indicam que a ativação da resposta imune natural pode ser útil, além de em protocolos de imunização, em condições onde não haja uma boa resposta imune celular, como é o caso de pacientes com a LC difusa. Pereira et al. (2009) mostraram que a imunoterapia com BCG, associado ao tratamento quimioterápico, ativou células da imunidade natural e causou a melhora clínica de um paciente com LC difusa, com controle de várias lesões e diminuição entre os períodos de recaídas, diminuindo o uso de fármacos e melhorando a qualidade de vida do paciente.

A importância da imunidade natural tem sido cada vez mais evidenciada, e o conhecimento e a manipulação dos seus componentes pode favorecer o resultado da infecção em benefício do hospedeiro. Este estudo evidencia a presença da IL-32 γ nas lesões de LTA, e demonstrou a necessidade de TLR4 para a produção de citocinas (TNF e IL-10) na infecção de células humanas com *L.(V.)braziliensis*. Estes resultados podem contribuir para a elaboração de futuros protocolos de imunização ou imunoterapia para infecções com *L. (V.) braziliensis*, e abre novas perguntas para maiores investigações a respeito da interação da *L.(V.) braziliensis* com células humanas.

6 CONCLUSÕES

Geral: As citocinas IL-32 γ , TNF e IL-10 estão presentes nas lesões de pacientes com LTA forma cutânea e mucosa e a produção de TNF e IL-10 induzida pela amastigota de *L. (V.) braziliensis* é consistentemente dependente de TLR4.

Específicas:

Somente a isoforma γ da IL-32 foi expressa nos tecidos de pacientes com LTA cutânea e mucosa em quantidade semelhante, assim como a IL-10 que estava expressa nas duas formas clínicas, no entanto o TNF estava significativamente mais elevado nas lesões de pacientes com a forma mucosa.

As formas amastigota de *L. braziliensis* foram capazes de induzir a expressão de IL-32 em CMN humanas, mostrando pela primeira vez que um parasito é capaz de induzir a expressão da IL-32.

Amastigota de *L. braziliensis* foram capazes de induzir TNF e IL-10 em células mononucleares humanas sensibilizadas com IFN γ .

A produção de TNF e IL-10 induzida pela amastigota de *L.(V.) braziliensis* foi dependente de TLR4.

O agonista de TLR4 (LPS) induziu aumento de TNF mas não de IL-10 nas CMN infectadas com *L. (V.) braziliensis*.

A citocina IFN γ aumentou a expressão de TLR4 nos monócitos/macrófagos humanos e a infecção pela amastigota de *L.(V.) braziliensis* pode reduzir essa expressão na membrana, possivelmente pela internalização dos TLR4.

REFERÊNCIAS¹

- Abou Fakher FH, Rachinel N, Klimczak M, Louis J, Doyen N 2009. TLR9 dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. *J Immunol.* 182(3):1386-96.
- Ahmed S, Colmenares M, Soong L, Goldsmith-Pestana K, Munstermann L, Molina R, McMahon-Pratt D 2003. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun.* 71(1):401-10.
- Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S 2007. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med.* 261(6):511-28.
- Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M 2003. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(7):861-70.
- Alsaleh G, Sparsa L, Chatelus E, Ehlinger M, Gottenberg JE, Wachsmann D, Sibilia J 2010. Innate immunity triggers IL-32 expression by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 12 (4): 135-146.
- Alvarl, J, Velez I D, Bern C, Hyerrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Den Boer M, The Who Leishmaniasis Control Team 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One* 7 (5): 1-12.
- Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Abegão R, de Camargo R, Duarte MI, Neto VA 2009. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *Journal European Academy of Dermatology and Venereology* 23: 1026 - 1034.
- Amato VS, de Andrade HF, Duarte MI 2003. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop.* 85(1):39-49.
- Ampuero J, Rios AP, Carranza-Tamayo CO, Romero GA 2009. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(7): 992-7.
- Antinori S, Schifanella L, Corbellino M 2012. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31(2):109-18.
- Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 30 (12-13):1269-81.
- Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP 2012. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. *PLoS Negl Trop Dis*; 6(2): 1-11.

Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro De Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho E 2002. Up-Regulation of Th1 type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity* 70: 6734-6740.

Bacha HA, Tuon FF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, Oliveira J, Nicodemo AC, Quiroga MM, Mascheretti M, Boulos M, Amato VS. 2011. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105(3):173-8.

Bae S, Kang D, Hong J, Chung B, Choi J, Jhun H, Hong K, Kim E, Jo S, Lee S, Kim S H, Kim S 2012. Characterizing antiviral mechanism of interleukin-32 and a circulating soluble isoform in viral infection. *Cytokine* 58 (1): 79 - 86.

Bai X; Ovrutsky A R, Kartalija M, Chmura K, Kamali A, Honda JR, Oberley-deegan RE, Dinarello CA, Crapo JD, Chang L, Chan ED 2011. IL-32 expression in the airway epithelial cells of patients with Mycobacterium avium complex lung disease. *International Immunology* 23(11): 679-691.

Bai X, Kim SH, Azam T, McGibney MT, Huang H, Dinarello CA, Chan ED 2010. IL-32 is a host protective cytokine against Mycobacterium tuberculosis in differentiated THP-1 human macrophages. *J Immunol.* 184 (7): 3830-3840.

Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres A, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (Lpg) activates NK cells through Toll-Like Receptor-2. *Mol Biochem Parasitol.* 130 (2): 65-74.

Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, Martin MU, Mantovani A, Muzio M 2002. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 99(9): 3427-31.

Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M, Barral A, Almeida RP, Mayrink W, Locksley R, Gollob KJ 2001. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 69(5):3232-9.

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.

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

Cagnard N, Letourneur F, Essabbani A, Devauchelle V, Mistou S, Rapinat A, Decraene C, Fournier C, Chiocchia G 2005. Interleukin-32, CCL2, PF4F1 and GFD10 are the only

cytokine/chemokine genes differentially expressed by in vitro cultured rheumatoid and osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes. *Eur Cytokine Netw.* 16(4):289-92.

Calvopina M, Barroso PA, Marco JA, Korenaga M, Cooper PJ 2006. Efficacy of vaccination with a combination of leishmania amastigote antigens and the lipid analogue ONO-4007 for immunoprophylaxis and immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in a murine model of new world cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 24: 5645–5652.

Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão Filho SP 2011. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res.* 108(3):671-7.

Carvalho ML, de Andrade AS, Fontes CJ, Hueb M, de Oliveira Silva S, Melo MN 2006. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Trop.* 98(3):277-85.

Chen L Y, Zuraw B L, Zhao M, Liu F T, Huang S, and Pan Z K 2003. Involvement of protein tyrosine kinase in Toll-like receptor 4-mediated NF-kappa B activation in human peripheral blood monocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284(4):607-13.

Choi JD, Bae SY, Hong JW, Azam T, Dinarello CA, Her E, Choi WS, Kim BK, Lee CK, Yoon DY, Kim SJ, Kim SH 2009. Identification of the most active interleukin-32 isoform. *Immunology.* 126(4):535-42.

Choi J, Bae S, Hong J, Ryoo S, Jhun H, Hong K, Yoon D, Lee S, Her E, Choi W, Kim J, Azam T, Dinarello CA, Kim S 2010. Paradoxical effects of constitutive human IL-32{gamma} in transgenic mice during experimental colitis. *Proc Natl Acad Sci.* 107(49):21082-6.

Daifalla NS, Bayih AG, Gedamu L 2011. Immunogenicity of *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase B1 and peroxidoxin 4 in Balb/c mice: the contribution of toll-like receptor agonists as adjuvant. *Experimental Parasitology* 129: 292–298.

Das S, Rani M, Pandey K, Sahoo GC, Rabidas VN, Singh D, Das P 2012. Combination of paromomycin and miltefosine promotes TLR4-dependent induction of antileishmanial immune response in vitro. *J Antimicrob Chemother* 67: 2373–2378.

de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, di Donato JA, Sexton AMC, Conville MJ, Handman E, Schofield L 2003. Myd88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-Like Receptor 2 signaling. *European Journal of Immunology* 33: 2822–2831.

Faria DR, Gollob KJ, Schrieffer A, Machado PRL, Carvalho LP, Aure M, Jesus RD, Carvalho EM, Dutra WO 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and Immunity* 73: (12) 7853-9.

Fitzgerald K A, Palsson-McDermott E M, Bowie A G, Jefferies C A, Mansell A S, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte M T, McMurray D, Smith D E, Sims J E,

Bird T A, O'Neill L A 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.

Flandin JF, Chano F, Descoteaux A 2006. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma primed macrophages. *Eur J Immunol.* 36: 411–20.

Follador I, Araujo C, Orge G, Cheng LH, de Carvalho LP, Bacellar O, Almeida RP, Carvalho EM 2002. Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine* 20: 1365–1368.

Gallego C, Golenbock D, Gomez MA, Saravia NG 2011. Toll-Like Receptors participate in macrophage activation and intracellular control of *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Infection and Immunity.* 79 (7): 2871-9.

Gasim S, Elhassan AM, Khalil EA, Ismail A, Kadaru AM, Kharazmi A, Theander TG 1998. High levels of plasma IL-10 and expression of IL-10 by keratinocytes during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 111(1):64-9.

Gautam S, Kumar R, Maurya R, Nylén S, Ansari N, Rai M, Sundar S, Sacks D 2011. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 204(7):1134-7.

Gontijo B, de Carvalho ML 2003. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36: 71-80.

Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA 1990. *Leishmania major* amastigotes initiate the l-arginine-dependent killing mechanism in ifn-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Immunology.* 145: 4290-7.

Guerra CS, Silva RM, Carvalho LO, Calabrese KS, Bozza PT, Côrte-Real S 2010. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania amazonensis*. *Int J Exp Pathol.* 91: 451–9.

Guimarães LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho EM 2006. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(7):712-5.

Guizani-Tabbane L, Ben-Aissa K, Belghith M, Sassi A, Dellagi K 2004. *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. *Infection and Immunity.* 72: 2582-9.

Hayes, M P.; Freeman, S L.; Raymond, P D 1995. IFN- γ priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. *Cytokine*, 7 (5): 427–435.

Heinhuis B, Koenders MI, van Riel PL, van de Loo FA, Dinarello CA, Netea MG, van den Berg WB, Joosten LA 2011. Tumour necrosis factor alpha-driven IL-32 expression in rheumatoid arthritis synovial tissue amplifies an inflammatory cascade. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70: 660-67.

Hermann P, Rubio M, Nakajima T, Delespesse G, Sarfati M 1998. CD80, and MHC class I expression release and selectively enhances IL-12p70, gram-negative bacteria-induced IL-10 differentially regulates gram-positive and IFN- α priming of human monocytes. *J Immunol*.161:2011-2018.

Hume D A, Underhill D M. Sweet M J, Ozinsky A O, Liew F Y, Aderem A 2001. Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. *BMC Immunol*. 2: 2172-2183.

Husebye H, Aune MH, Stenvik J, Samstad E, Skjeldal F, Halaas Ø, Nilsen NJ, Stenmark H, Latz H, Lien E, Mollnes TE, Bakke O, Espevik T 2010. The Rab11a GTPase Controls Toll-like Receptor 4-Induced Activation of Interferon Regulatory Factor-3 on Phagosomes. *Immunity* 33: 583–596.

Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MM, Turco SJ, Soares RP 2013. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasit Vectors* 6 (54): 1-11.

Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, Zangger H, Melanie Revaz-Breton M, Lye L, Hickerson SM, Beverley SM, Acha-Orbea H, Launois P, Fasel N, Masina S 2011. *Leishmania* RNA Virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* 331: 775–778.

Jayakuma A, Castilho TM, Park E, Goldsmith-Pestana K, Blackwell JM, McMahon-Pratt D 2011. TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8⁺ T cell responses providing protection against *Leishmania* (Viannia). *Plos One* 5(6): 1-11.

Jeong HJ, Shin SY, Oh HA, Kim MH, Cho JS, Kim HM 2011. IL-32 up-regulation is associated with inflammatory cytokine production in allergic rhinitis. *J Pathol*. 222(4): 553-63.

Jones B W, Means T K, Heldwein K A, Keen M A, Hill P J, Belisle J T, Fenton M J. 2001. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol* 69:1036-1044.

Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, Wiese K, Golightly L, Fikrig E, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD 1987. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* braziliensis. *J Infect Dis*.156(1):73-83.

- Joosten LA, Netea MG, Kim SH, Yoon DY, Oppers-Walgreen B, Radstake TR, Barrera P, van de Loo FA, Dinarello CA, van den Berg WB 2006. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci*. 103: 3298-3303.
- Kang JW, Choi SC, Cho MC, Kim HJ, Kim JH, Lim JS, Kim SH, Han JY, Yoon DY 2009. A proinflammatory cytokine interleukin-32 promotes the production of an anti-inflammatory cytokine interleukin-10. *Immunology* 128(1): 532-540.
- Kavoosi G, Ardestani SK, Kariminia A, Alimohammadian MH 2010. *Leishmania major* lipophosphoglycan: discrepancy in Toll-Like Receptor signaling. *Experimental Parasitology* 124: 214–218.
- Kawai T, Akira S 2007. TLR signaling. *Semin Immunol* 19(1):24-32.
- Kemp K, Theander TG, Hviid L, Garfar A, Kharazmi A, Kemp M 1999. Interferon-gamma- and tumour necrosis factor-alpha-producing cells in humans who are immune to cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol*. 49(6):655-9.
- Khan M A, Kang J, Steiner T S 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology* 112: 651-660.
- Kim SH, Han SY, Azam T, Yoon DY, Dinarello CA 2005. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha. *Immunity* 22: 131-142.
- Kobayashi H, Yazlovitskaya EM, Lin PC 2010. Interleukin-32 positively regulates radiation-induced vascular inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 74(5):1573-9.
- Kobayashi M, Saitoh S, Tanimura N, Takahashi K, Kawasaki K, Nishijima M, Fujimoto Y, Fukase K, Akashi-Takamura S, Miyake K 2006. Regulatory Roles for MD-2 and TLR4 in Ligand-Induced Receptor Clustering. *J Immunol* 176:6211-6218.
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazi S, Smith DF, Müller I 2004. Toll-Like Receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania Major*. *Infect and Immunity* 72(4): 1920-8.
- Kurt-Jones E A, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger P E, Finberger R 2002. Role of Toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophil. *Blood*. 100: 1860-1868.
- Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G 2005. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harbouring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cellular Microbiology* 7 (3): 383–392.
- Lessa HA, Lessa MM, Guimarães LH, Lima CM, Arruda S, Machado PR, Carvalho EM 2012. A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 106(6):376-81.

- Li W, Liu Y, Mukhtar MM, Gong R, Pan Y, Rasool ST, Gao Y, Kang L, Hao Q, Peng G, Chen Y, Chen X, Wu J, Zhu Y 2008. Activation of interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to influenza A virus infection. *PLoS One* 3: 1-9.
- Liese J, Schleicher U, Bogda C 2008. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* 213: 377–387.
- Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg.* 49(3): 348-56.
- Mansell A E, Brint J A, O'Neill L A, Hertzog P J 2004. Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol Chem* 279: 37227-37230.
- Marques MJ, Volpini AC, Machado-Coelho GL, Machado-Pinto J, da Costa CA, Mayrink W, Genaro O, Romanha AJ 2006. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 54(1):37-43.
- Marsden PD 1986. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escamel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 80(6):859-76.
- Martínez-Salazar B, Berzunza-Cruz M, Becker I 2008. *Leishmania mexicana* DNA activates murine macrophages and increases their TLR9 expression. *Gac Med Mex.* 144(2):99-104
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A Jr 1997. A homologue of *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.
- Meyer N, Zimmermann M, Burgler S, Bassin C, Woehrl S, Moritz K, Rhyner C, Indermitte P, Schmid-Grendelmeier P, Akdis M, Menz G, Akdis CA 2010. IL-32 is expressed by human primary keratinocytes and modulates keratinocyte apoptosis in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 125: 858-865.
- Mita Y, Dobashi K, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M 2001. Toll-like receptor 2 and 4 surface expressions on human monocytes are modulated by interferon gamma and macrophage colony-stimulating factor. *Immunol Lett.* 78(2): 97- 101.
- Moschen AR, Fritz T, Clouston AD, Rebhan I, Bauhofer O, Barrie HD, Powell EE, Kim SH, Dinarello CA, Bartenschlager R, Jonsson JR, Tilg H 2011. Interleukin-32: a new proinflammatory cytokine involved in hepatitis C virus-related liver inflammation and fibrosis. *Hepatology.* 53(6):1819-29.
- Mukherjee AK, Gupta G, Adhikari A, Majumder S, Mahapatra SK, Majumdar SB, Majumdar S 2012. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: role of TLR4 and TLR9. *International Immunopharmacology* 12: 565–572.

Netea MG, Azam T, Ferwerda G, Girardin SE, Walsh M, Park JS, Abraham E, Kim JM, Yoon DY, Dinarello CA, Kim SH, 2005. IL-32 synergizes with nucleotide oligomerization domain (NOD) 1 and NOD2 ligands for IL-1 β and IL-6 production through a caspase 1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci.* 102: 16309-16314.

Netea MG, Azam T, Lewis EC, Joosten LA, Wang M, Langenberg D, Meng X, Chan ED, Yoon DY, Ottenhoff T, Kim SH, Dinarello CA 2006. *Mycobacterium tuberculosis* induces interleukin-32 production through a caspase-1/IL-18/interferon-gamma-dependent mechanism. *PLoS Med* 3: 1310-1329.

Netea MG, van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA 2008. The role of NLRs and TLRs in the activation of the inflammasome. *Expert Opin Biol Ther.*8(12):1867-72.

Novoa R, Bacellar O, Nascimento N, Cardoso M, Ramasawmy R, Oliveira WN Schrieffer A, Carvalho EM 2011 . IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and IL-27) In *L. Braziliensis* Infection. *Parasite Immunology* 33: 132–136.

O'Mahony D S, Pham U, Iyer, Hawn R T, Liles W C 2008. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes and macrophages. *Int J Med Sciences* 5: 1-8.

Oliveira MAP, Pires AS, Bastos RS, Lima GMCA, Pinto SA, Pereira LIA, Pereira AJCS, Abrahamssohn IA, Dorta ML, Ribeiro-Dias F 2010. Leishmania spp. Parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 52 (2): 83-88.

Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM 2012. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol.*3(79): 1-17.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91: 1390-1395.

Pereira LI, Dorta ML, Pereira AJ, Bastos RP, Oliveira MA, Pinto SA, Galdino H Jr, Mayrink W, Barcelos W, Toledo VP, Lima GM, Ribeiro-Dias F 2009. 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 Trop Med Hyg* 81(3):378-83.

Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degraive W, Fernandes O 1999. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 37(6): 1819-23.

Raman VS, Bhatia A, Picone A, Whittle J, Bailor HR, Donnell JO, Pattabhi S, Guderian JA, Mohamath R, Duthie MS, Reed SG 2010. Applying TLR synergy in immunotherapy: implications in cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 185: 1701-1710.

- Rasool ST, Tang H, Wu J, Li W, Mukhtar MM, Zhang J, Mu Y, Xing HX, Zhu Y 2008. Increased level of IL-32 during human immunodeficiency virus infection suppresses HIV replication. *Immunol Lett* 117: 161-167.
- Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, Militão de Albuquerque Mde F, Jardim ML, Abath FG 2002. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol.* 40(10): 3572-6.
- Saraiva M, O'garra A 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 10(3): 170-81.
- Scharton TM, Scott P 1993. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med.* 178(2):567-77.
- Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, Lee DJ, Teles RM, Ochoa MT, Komisopoulou E, Sarno EN, Rea TH, Graeber TG, Kim S, Cheng G, Modlin RL 2012. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med.* 18(4): 555-63.
- Scherle P A, Jones E A, Favata M F, Daulerio A J, Covington M B, Nurnberg S A, Magolda R L, Trzaskos J M 1998. Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *J Immunol* 161(10): 5681-5686
- Shakya N, Sane SA, Vishwakarma P, Gupta S 2012. Enhancement in therapeutic efficacy of miltefosine in combination with synthetic bacterial lipopeptide, Pam3Cys against experimental Visceral Leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 131(3):377-82.
- Shibata T, Motoi Y, Tanimura N, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K 2011. Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages senses Gram-negative bacteria and induces a unique set of LPS-dependent genes. *Int. Immunol* 23 (8): 503–510.
- Shioya M, Nishida A, Yagi Y, Ogawa A, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y, Andoh A 2007. Epithelial overexpression of interleukin-32 alpha in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 149: 480-486.
- Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K 2006. Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther.* 8: 166-179
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 239-251.
- Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 31(8):423-31.

Silveira TG, Arraes SM, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MV, Roberto AC, Ramos M, Nerilo Sobrinho A, Ishikawa E, Shaw J 1999. The laboratory diagnosis and epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Paraná State, southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32(4):413-23.

Singh RK, Srivastava A, Singh N 2012. Toll-like receptor signaling: A perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiol Res*.167(8):445-51.

Souza MA, Castro MC, Oliveira AP, Almeida AF, Reis LC, Silva CJ, Brito ME, Pereira VR 2012. 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

Takeda K, Kaisho T, Akira S 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev. Immunol* 21: 335-376.

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

Tuon FF, Fernandes ER, Duarte MI, Amato VS 2012. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 54(3):159-63.

Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L 2009. Distinct Roles for MyD88 and Toll-Like Receptor 2 during *Leishmania braziliensis* Infection in Mice. *Infect Immun* 77 (7): 2948–2956.

Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJ, Oliveira MP, Rutowitsch MS, Da-Cruz AM 2008. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermatol*. 47(9): 926-32.

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 90: 31-37.

Xu Q, Pan X, Shu X, Cao H, Li X, Zhang K, Lu J, Zou Y, Li X, Liu H, Zhang Y, Yang D, Ning Q, Shen G, Li G 2012. Increased interleukin-32 expression in chronic hepatitis B virus-infected liver. *J Infect*.8: 1-7.

Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR 2010. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health* 15(1): 68-76.

Zhang D, Zhang G, Hayden M S, Greenblatt M B, Bussey C, Flavell R A, Ghosh S 2004. Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303: 1522-1526.

ANEXOS

Anexo 1 – TCLE

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 3521-1075 ou 3521-1076.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA: Título do Projeto: Avaliação do papel da nova citocina IL-32 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:

- Fátima Ribeiro Dias – pesquisador responsável (coordenador, Setor de Imunologia/IPTSP/UFG); Miriam Leandro Dorta – professora/pesquisadora (Setor de Imunologia/IPTSP/UFG); Milton A. P. de Oliveira – professor/pesquisador (Setor de Imunologia/IPTSP/UFG); Hélio Galdino Jr. (aluno de doutorado em Imunologia – PPGMT/IPTSP/UFG);- Ledice I. A. Pereira (professora/pesquisadora, médica infectologista, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias/IPTSP/UFG); Ana Joaquina C. Pereira (médica infectologista, Ambulatório de Endemias – Hospital de Doenças Tropicais, Goiânia, Goiás); Sebastião A. Pinto (médico patologista, Mestre em Patologia, Instituto Goiano de Hematologia e Oncologia);

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 resposta de determinadas subpopulações das células sanguíneas aos antígenos de leishmania e a citocina IL-32, 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, bem como pesquisar citocinas (produtos das células). 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. 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.

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 n.º: sexo: m f

Data nascimento:v...../.....

Endereço.....no
.....apto:.....

Bairro:.....

Cidade:.....

Cep:.....

Telefone:

ddd(.....).....

abaixo assinado, concordo em participar do estudo Avaliação do papel da nova citocina IL-32 na infecção causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, 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: _____



PROTOCOLO Nº
165 / 08

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino)

Pesquisa

II - Identificação:

- ☐ **Título do projeto:** Avaliação do papel da nova citocina IL-32 na infecção causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.
- ☐ **Pesquisador(es) Responsável(veis):** Fátima Ribeiro Dias, Milton Adriano Pelli de Oliveira, Miriam Leandro Dorta, Ledice Inácia de Araújo Pereira, Hélio Galdino Jr, Aline Carvalho Batista, Sebastião Alves Pinto, Ana Joaquina C. S. Pereira, Leda Quércia Vieira, Lucianna Gonçalves Nepomuceno, Ildefonso Alves da Silva Jr, Walbert Pires de Oliveira Jr., Denisy Marques Mendanha, Nathália Ferreira Lima.
- ☐ **Instituição onde será realizado:** Universidade Federal de Goiás: IPTSP e Faculdade de Odontologia; Hospital Anuar Auad – HDT; Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia-INGOH; Banco de Sangue – Hospital das Clínicas, Instituto de Ciências Biológicas -UFMG
- ☐ **Data de apresentação ao CEP:** 05/12/2008

III - Objetivos do projeto: Avaliar o papel de um novo imunorregulador, a IL-32, na infecção causada por *Leishmania (V.) braziliensis*.

IV - Sumário do projeto:

- ☒ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos:** Será utilizado sangue periférico colhido de 30 pacientes positivos para leishmaniose e 40 pacientes normais, além de biopsias das lesões. As biopsias serão maceradas e inoculadas em 30 camundongos isogênicos deficientes de IFN γ mantidos no biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP)/UFG e /ou meio de cultivo (meio Grace completo). Os parasitos isolados serão estocados em nitrogênio líquido no "Leishbank" (banco imunobiológico de leishmaniose da região centro – oeste). Questiona-se a necessidade de utilização dos referidos animais já que os parasitos, conforme descrito no projeto, podem ser replicados e isolados em meio de cultura.

IV – Comentários do relator frente às orientações do COBEA

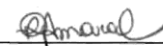
- ☐ **Estrutura do protocolo:** Protocolo bem embasado cientificamente, mas com falhas na formatação exigida pelo CEP, tornando confusa sua compreensão e análise.
- ☐ **Análise do TCLE (se for o caso):** Existem 02 TCLEs anexados, idênticos. Os mesmos são devidamente esclarecedores quanto ao objetivo do projeto, pesquisadores envolvidos e ações do sujeito.
- ☐ **Análise de sofrimento imposto, métodos alternativos e benefícios:** Conforme descrito no próprio corpo do projeto, é possível, apesar de difícil, o isolamento do agente em meios de cultura. Questiona-se a necessidade de utilização de animais para inoculação.
- ☐ **Análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** **FÍSICO:** podem ocorrer acidentes como mordidas ou eventuais cortes com a manipulação de seringas, tesouras e pinças. Para tanto, os pesquisadores sempre utilizarão luvas de procedimento (e de malha de aço durante o sacrifício), máscara de acrílico, jalecos, óculos de proteção e serão devidamente treinados para a manipulação dos instrumentais.
BIOLÓGICO: As leishmanias serão obtidas de pacientes, portanto são agentes infecciosos para os seres humanos. Para tanto os pesquisadores sempre utilizarão luvas de procedimento, máscara de acrílico, jalecos, óculos de proteção e serão devidamente treinados. Caso ocorra a inoculação acidental, o pesquisador será encaminhado a Dra. Ledice Inácia Araujo Pereira (Médica Infectologista IPTSP/UFG responsável pelo ambulatório de leishmaniose do HDT) para os procedimentos necessários e início do tratamento do pesquisador acidentado. **PSICOLÓGICO:** A manipulação e o sacrifício de animais de laboratório podem causar estresse psicológico aos pesquisadores, sendo assim, só participarão destes procedimentos aqueles pesquisadores que se sentirem aptos.
- ☐ **Necessidade do número de animais:** Conforme descrito em projeto de pesquisa, tanto o isolamento em meio de cultura quanto a inoculação em animais não são métodos eficientes de multiplicação ou obtenção de parasitos. Questiona-se, portanto, a utilização de animais para inoculação, já que esta forma de multiplicação não apresenta a eficiência necessária e pode ser substituída pelos meios de cultivo.
- ☐ **Análise dos métodos de intervenção e eutanásia:** A decapitação é uma forma eficaz de eutanásia. É importante, no entanto, que no momento de sua execução, o pesquisador tenha certeza de que os animais encontram-se devidamente insensibilizados pelos fármacos aplicados, já que a ação dos mesmos pode variar entre os indivíduos.
- ☐ **Destino do animal:** Encontra-se descrita apenas a destinação dos animais que desenvolverem lesões após a inoculação. Questiona-se o destino dos outros animais e solicita-se detalhamento sobre a possibilidade de estes se encontrarem infectados sem, no entanto, demonstrarem lesões.

V - Parecer do CEP: pendências esclarecidas e itens salientados devidamente corrigidos. Projeto APROVADO.

VI - Data da reunião: 27/04/2009

Relator

Relator do Parecer



Rita Goreti Amaral

Coordenador do COEP/PRPPG/UFG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgmtsp.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE HÉLIO GALDINO JÚNIOR -

Aos vinte e seis dias do mês de julho do ano de 2013 (26/07/2013), às 14 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. FÁTIMA RIBEIRO DIAS, MARIA IMACULADA MUNIZ BARBOZA JUNQUEIRA, MARINA TIEMI SHIO, MARA RÚBIA NUNES CELES e RUY DE SOUZA LINO JÚNIOR, para, sob a presidência do (a) primeiro (a), e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **“AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS (INTERLEUCINA 32, INTERLEUCINA 10, FATOR DE NECROSE TUMORAL) E RECEPTORES SIMILARES A TOLL (TLR 4) NA INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) sp*”**, em nível de DOUTORADO, área de concentração em IMUNOLOGIA, de autoria de HÉLIO GALDINO JÚNIOR, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, 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 o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1081/2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora

Aprovado / Reprovado

Prof. (a) Dr. (a) Fátima Ribeiro Dias

Aprovado

Prof. (a) Dr. (a) Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Aprovado

Prof. (a) Dr. (a) Marina Tiemi Shio

Aprovado

Prof. (a) Dr. (a) Mara Rúbia Nunes Celes

APROVADO

Prof. (a) Dr. (a) Ruy de Souza Lino Júnior

APROVADO

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato Habilitado, (**Habilitado ou não Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, na área de concentração em IMUNOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 h 30 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical 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.

Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias (IPTSP/UFG) Fátima Ribeiro Dias

Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira (UnB/DF) Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Profa. Dra. Marina Tiemi Shio (UNIFESP/SP) Marina Tiemi Shio

Profa. Dra. Mara Rúbia Nunes Celes (IPTSP/UFG) Mara Rúbia Nunes Celes

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior (IPTSP/UFG) Ruy de Souza Lino Júnior

Secretário da Pós-Graduação: Kariny Vieira Soares Silva

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