

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E
SAÚDE PÚBLICA

LEDICE INACIA DE ARAUJO PEREIRA

Avaliação dos monócitos na Leishmaniose Tegumentar Americana

ORIENTADORA: PROF^a DRA FÁTIMA RIBEIRO-DIAS

TESE DE DOUTORADO

Goiânia – Goiás - Brasil

Agosto 2012



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

LEDICE INACIA DE ARAUJO PEREIRA

Avaliação dos monócitos na Leishmaniose Tegumentar Americana

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

Orientadora: Profa Dra Fátima Ribeiro-Dias

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro CNPq, CAPES e FAPEG

Goiânia – Goiás - Brasil

Agosto 2012

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

P436a Pereira, Ledice Inacia de Araujo.
 Avaliação dos monócitos na Leishmaniose Tegumentar
Americana [manuscrito] / Ledice Inacia de Araujo Pereira. –
2012.
 87 f.: figs, tabs.

 Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Ribeiro-Dias.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2012.
 Bibliografia.
 Inclui lista de tabelas, figuras, símbolos, siglas e abreviaturas.
 Anexos.

 1. Leishmaniose Tegumentar Americana – Estudo. 2.
 Monócitos – Avaliação. 3.

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

Aluna: Ledice Inacia de Araujo Pereira

Orientadora: Profa Dra Fátima Ribeiro-Dias

Membros:

1: Mário Leon Silva Vergara
2: Joaquim Caetano de Almeida Neto
3: João Alves de Araujo Filho
4: Miriam Leandro Dorta

Data: 31 de Agosto de 2012

*Não sei se a vida é curta ou longa para nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
Se não tocarmos os corações das pessoas.
E isso não é coisa do outro mundo,
É o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais,
Mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.
Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.*

Cora Coralina

Dedico este trabalho a

Wilson, Mariana, Pedro Ivo, João Victor e Sofia

AGRADECIMENTOS

Fátima Ribeiro-Dias – IPTSP/UFG

Miriam L. Dorta – IPTSP/UFG

Hélio Galdino Junior – FE/UFG

Ildefonso Alves da Silva Jr – IPTSP/UFG

Camila Imai Morato – IPTSP/UFG

Anna Karoline A. Fleuri – IPTSP/UFG

Milton A. P. Oliveira – IPTSP/UFG

Ana Joaquina C. S. Pereira – HDT/SES-GO

Sebastião Alves Pinto – Ingoh e FM/IPTSP/UFG

Vicente Toledo – FF/UFGM

Wilson Mayrink – ICB/UFGM

Fernanda B. Duarte – Hospital Unique/Goiânia

Colegas do DMTD/UFG

Professores do PPG em Medicina Tropical e Saúde Pública

Residentes de Infectologia

William Barbosa - orientador do meu trabalho de Mestrado

Hospital de Doenças Tropicais/SES-GO

Instituto Goiano de Hematologia (Ingoh)

Alcy Inacio de Araujo

Pacientes e controles

CAPES/CNPq\FAPEG

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	viii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA	1
JUSTIFICATIVA.....	16
OBJETIVOS.....	17
ARTIGO 1 – Increase of NK Cells and Proinflammatory Monocytes Are Associated with the Clinical Improvement of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis after Immunochemotherapy with BCG/ Leishmania Antigens: a case report.	18
ARTIGO 2 – Alterações nas subpopulações de monócitos e desequilíbrio entre as citocinas fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 10 (IL-10) na leishmaniose cutânea localizada.....	19
DISCUSSÃO FINAL.....	49
CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética - TCLE	73
Anexo 2 - Lesões Clínicas.....	81
Anexo 3 - Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes.....	82
Anexo 4 - Trabalhos publicados durante o Doutorado.....	84
Anexo 5 - Trajetória de vida acadêmica.....	85

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. Adaptado de Reithinger et al. 2007)	3
Figura 2. Espectro clínico da Leishmaniose humana. Adaptado de Murray et al. 2005 ..	4
Artigo 2	
Tabela 1. Dados dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana e controles	26
Figura 1. A porcentagem de monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁺ está aumentada em pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada.	28
Figura 2. Porcentagens de monócitos intermediários (CD14 ^{hi} CD16 ⁺) e não clássicos (CD14 ^{lo} CD16 ⁺) aumentam no sangue de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada.....	29
Figura 3. Alterações nas porcentagens das subpopulações de monócitos após ativação com LPS..	31
Figura 4. Análise da expressão intracelular de TNF e IL-10 em monócitos CD14 ⁺ de hemoculturas estimuladas com LPS.....	32
Figura 5. Monócitos CD14 ⁺ expressam TNF e IL-10 após ativação com LPS.....	34
Figura 6. Elevada produção de TNF em hemoculturas de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, antes e após ativação via TLR4 ou TLR2 ou com antígeno de <i>L. (V.) braziliensis</i>	36
Figura 7: Correlação entre as concentrações de TNF e IL-10 secretados nas hemoculturas de pacientes com leishmaniose cutânea localizada e de indivíduos saudáveis.. ..	38
Figura 8. Correlação positiva entre o número de lesões e as concentrações de TNF nos soros e hemoculturas de pacientes com leishmaniose cutânea localizada.....	40

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

BALB/C: Linhagem de camundongo isogênico

BCG : Bacilo Calmette-Guérin

C57BL/6 : Linhagem de camundongo isogênico

CD11b: Integrina com alta expressão nos monócitos

CD14, CD16, CD33: Marcadores de monócitos

CpG DNA: Regiões do DNA onde citosina ocorre próximo a guanina numa sequência linear de bases, agonista de TLR9

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético

ELISA: Ensaio imunoenzimático

FcγRIII: Receptor para a porção Fc de imunoglobulina G

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HDT: Hospital de Doenças Tropicais

HE: Hematoxilina-eosina

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

ID: Intradérmico

IFLA/BR/1967/PH8 ou PH: cepa de *Leishmania (L.) amazonensis*

IFNγ: Interferon gama

IHC: Imunoistoquímica

IIF: Imunofluorescência indireta

IL: Interleucina

IMG3: Isolado de *L. (V.) braziliensis*

INGOH: Instituto Goiano de Hematologia e Oncologia

Inos: Óxido nítrico sintase induzida

IRM: Intradermorreação de Montenegro

LC: Leishmaniose cutânea

LCD: Leishmaniose cutâneo-difusa

LCL: Leishmaniose cutânea localizada

LCM: Leishmaniose cutâneo-mucosa

LD ou DL: Leishmaniose disseminada

LM: Leishmaniose mucosa

LPS: Lipopolissacarídeo de bactérias

LRV1: Vírus que infecta a *Leishmania*

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose visceral

MAB: Iniciais do paciente

MAB3: *L. (L.) amazonensis* isolada do paciente MAB

MAB6: *L. (L.) amazonensis* isolada do paciente MAB

M-CSF: Fator estimulante de colônia de macrófago

MHCII: Molécula classe II do Complexo de Histocompatibilidade Principal

MHOM\BR\1975\M2903 ou M2903: Cepa de *Leishmania (V.) braziliensis*

NO: Óxido nítrico

NK: Células Natural Killer

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PPD: Proteína purificada derivada de micobactéria

RNA: Ácido ribonucleico

SSU rDNA: Subunidade ribossomal de ácido desoxiribonucleico

Th1, Th2: Linfócitos T auxiliares tipo 1 e tipo 2

TGF: Fator transformador do crescimento)

TLR: Receptor similar a Toll

TNF: Fator de necrose tumoral

Treg: Célula T reguladora

TU: Unidade de tuberculina

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é causada por protozoários do gênero *Leishmania* que infectam células do sistema fagocítico mononuclear, causando lesões na pele ou nas mucosas oral e nasofaríngea. Apesar dos vários estudos sobre a imunologia da LTA, o conhecimento ainda é insuficiente para a compreensão dos mecanismos que levam ao controle ou à persistência dos parasitos. Os monócitos são células do sangue que se subdividem em clássicos, não clássicos e intermediários, de acordo com a expressão de moléculas CD14 e CD16, apresentando diferenças fenotípicas e funcionais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação dos monócitos na LTA. Para tanto, foram avaliadas as alterações nas frequências dos monócitos CD14^{lo}CD16⁺ (não clássicos) e de células NK CD56⁺CD16⁺ (por citometria de fluxo) do sangue periférico de um paciente com leishmaniose cutânea difusa (LCD), antes e após imunoterapia (tratamento quimioterápico mais vacinas monovalentes de *L. (L.) amazonensis* e de *L. (V.) braziliensis* com BCG). Em seguida, em pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL), foram avaliadas as subpopulações de monócitos (CD14^{hi}CD16⁻, CD14^{hi}CD16⁺, CD14^{lo}CD16⁺, usando citometria de fluxo); a expressão de citocinas em monócitos CD14⁺ em hemoculturas ativadas com lipopolissacarídeo (LPS; usando citometria de fluxo); a produção de citocinas pro- (fator de necrose tumoral, TNF) e antiinflamatória (interleucina 10, IL-10) secretadas em hemoculturas ativadas com agonistas de receptores similares a *Toll* [TLR2 (Pam₃Cys) e TLR4 (LPS)] ou antígenos de *L. (V.) braziliensis* (Ag; dosados por ELISA) e associação com dados clínicos. No paciente com LCD, houve um aumento da frequência de monócitos CD14^{lo}CD16⁺ e de células NK, provavelmente associado ao uso do BCG, que contribuiu para a cura clínica das lesões causadas por *L. (L.) amazonensis*. Nos pacientes com LCL, as subpopulações de monócitos CD16⁺ estavam aumentadas no sangue periférico, antes do tratamento. Foi detectada uma expressão similar das citocinas TNF e IL-10 intracelularmente nos monócitos CD14⁺, após cultura com LPS, de pacientes com LCL e indivíduos controles. Não foi possível avaliar quais subpopulações de monócitos estavam produzindo as citocinas, porque após ativação dos monócitos com LPS houve alterações nas porcentagens das subpopulações de monócitos. Após a ativação de hemoculturas com agonistas de TLR2 e TLR4 ou Ag, hemoculturas de pacientes com LCL produziram mais TNF e similares concentrações

de IL-10 em relação às hemoculturas de indivíduos saudáveis. Enquanto em indivíduos saudáveis foi detectada uma correlação positiva entre as concentrações de TNF e IL-10 produzidas após diferentes estímulos (LPS, Pam₃Cys e Ag), esta correlação não foi detectada nas hemoculturas de pacientes com LCL, exceto quando usado Pam₃Cys. Houve uma correlação positiva entre as concentrações de TNF, presentes no soro e produzidos antes e após diferentes estímulos nas hemoculturas, e o número de lesões dos pacientes com LCL. Os dados sugerem que ativar os monócitos pode levar ao controle da infecção em paciente com LCD, uma forma clínica em que não há uma eficiente resposta imune celular adquirida, sendo, portanto, importante ativar células da imunidade natural que possam causar regressão das lesões, diminuindo os custos com medicamentos e melhorando a qualidade de vida do paciente. Por outro lado, na LCL, alterações nas subpopulações de monócitos e um desequilíbrio na produção de citocinas pro- e antiinflamatórias podem contribuir para a imunopatogenia da doença. Nos casos estudados houve aumento de monócitos não clássicos e intermediários (CD14^{lo}CD16⁺, CD14^{hi}CD16⁺) e associação entre o número de lesões e a produção de TNF pelos monócitos. Uma compreensão sobre o papel das subpopulações de monócitos na LTA pode abrir novas perspectivas para a identificação de marcadores de gravidade da doença, bem como de futuros alvos terapêuticos na LTA.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is caused by *Leishmania* protozoan that infects mononuclear phagocytic cells leading to cutaneous or mucosal lesions. The mechanisms responsible for parasite control or persistence are not completely known. Human monocytes are blood cells subdivided into three subsets (classical, nonclassical and intermediate) according to the CD14 and CD16 expression that is associated with different phenotypical and functional characteristics. The aim of this study was to evaluate the profile of monocytes in ATL. First, it was analyzed the nonclassical monocytes (CD14^{lo}CD16⁺) and CD56⁺CD16⁺ NK cell frequencies in peripheral blood (by using flow cytometry) of a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) before, during and after immunochemotherapy (chemotherapy treatment together with *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* monovalent vaccines plus BCG). Then, in localized cutaneous leishmaniasis (LCL) patients (n = 32) and healthy donors, the three monocyte subsets (CD14^{hi}CD16⁻, CD14^{hi}CD16⁺, CD14^{lo}CD16⁺) were evaluated by flow cytometry; in the whole blood cultures we evaluated the expression of cytokines in CD14⁺ monocytes activated with lipopolysaccharide (LPS, by flow cytometry), and the secretion of proinflammatory (tumor necrosis factor, TNF) and antiinflammatory (interleukin 10, IL-10) after activation with Toll-like receptor agonists (TLR2 (Pam₃Cys), TLR4 (LPS)) or *L. (V.) braziliensis* antigen (Ag; ELISA was used). In DCL patient it was detected an increase in non classical monocytes and NK cell frequencies probably associated to BCG stimulation, contributing to the clinical cure of several lesions caused by *L. (L.) amazonensis*. In LCL patients, the CD16⁺ monocyte subsets were increased before treatment. A similar TNF and IL-10 expression in CD14⁺ monocytes activated with LPS was found in patients and controls. It was not possible to identify which monocyte subpopulation was the responsible for the TNF or IL-10 production due to alterations of the percentages of each subset after LPS stimulation. Activation through TLR2, TLR4 or with Ag leads to a higher production of TNF but not IL-10 in whole blood cultures of patients than of controls. Whereas in healthy controls there was a positive correlation between TNF and IL-10 production after different stimulations (LPS, Pam₃Cys and Ag), this was not observed in LCL patients, except for TLR2 stimulation. A positive correlation was detected between amount of TNF in serum or in activated-whole blood

cultures and the number of cutaneous lesions. These results suggested that nonclassical monocytes can contribute to the control of infection in DCL patient, a clinical form in which patients do not present acquired cellular immune response. In this case, activation of innate cells as monocytes can cause lesion regression decreasing costs with medicines and improving the life quality of the patients. On the other hand, in LCL patients monocyte subsets and cytokine imbalance, especially with increase of nonclassical and intermediate monocytes ($CD14^{lo}CD16^{+}$, $CD14^{hi}CD16^{+}$) and TNF, can contribute to leishmaniasis immunopathogenesis. To understand the role of monocyte subsets in ATL can open new avenues to the identification of biological markers of disease severity as well as new therapeutic targets to ATL treatment.

INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1. A Leishmaniose Tegumentar Americana

1.1. Epidemiologia e transmissão

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e/ou mucosas. É transmitida pela picada de insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. A maioria das infecções ocorre como zoonoses entre animais silvestres, geralmente roedores, sendo o homem um hospedeiro acidental. Os ciclos de transmissão, no entanto, estão se adaptando ao peridomicílio e se espalhando para áreas não endêmicas (Desjeux 2001, Gontijo & Carvalho 2003).

Nos últimos 20 anos tem-se observado um aumento do número de casos de todas as formas de Leishmaniose - doença emergente em algumas áreas e re-emergente em outras. Fatores como mudanças ambientais, migrações descontroladas, turismo ecológico, trabalho em áreas de risco, dificuldades de tratamento, hospedeiros imunocomprometidos, entre outros, propiciam uma grande variedade de contatos entre reservatório/homem e o vetor (Shaw 2007). Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em área de risco para transmissão de Leishmaniose e anualmente são estimados cerca de dois milhões de casos novos. (WHO 2004).

No Brasil, no período de 1988 a 2009, a LTA apresentou uma média anual de 27.093 casos notificados. Durante este período, observou-se uma tendência de crescimento da endemia, com os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e de 1995, quando atingiram níveis de 22,8 a 22,9 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. Ocorreu também expansão geográfica, pois, no início da década de 1980, foram registrados casos em 19 unidades federadas e, em 2003, a doença foi notificada em todos os estados. Em 1994, houve registro de casos autóctones em 1.861 municípios, o que representava 36,9% dos municípios do País e em 2005, houve uma expansão da doença para 2.068 municípios (37,2%) (Ministério da Saude 2011).

No estado de Goiás, foram notificados 1.610 casos de LTA, entre os anos de 2007 e 2010, dos quais 246 casos em 2007, 351 em 2008, 460 em 2009 e 553 em 2010.

A maioria dos casos era procedente dos municípios de Niquelândia, Baliza, São Miguel do Araguaia, Doverlândia, Minaçú, São Domingos, Rio Verde, Mineiros, Caiapônia, Divinópolis de Goiás, Itajá, Porangatú, Posse, Campos Belos, Jataí, Crixás, Jaraguá, Araguapaz, Montividiu do Norte, Rubiataba, Serranópolis e Uruaçu (SES-SINAM/SUS/MS).

No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* causadoras de LTA pertencem a dois subgêneros: (1) *Viannia*, representado, principalmente, pelas espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, associadas com lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou mucocutâneas e (2) *Leishmania*, representado pela espécie *L. (L.) amazonensis*, associada com o desenvolvimento de lesões cutâneas localizadas ou com a forma difusa da LTA. Dentre estas espécies, *L. (V.) braziliensis* é a mais prevalente no nosso meio e cerca de 1 a 10% dos pacientes acometidos apresentam a forma clínica mucosa ou mucocutânea (Ashford 2000, Gontijo & Carvalho 2003, Machado-Coelho et al. 2005, Ministério da Saúde 2007).

Durante o seu ciclo de vida (Figura 1), *Leishmania* apresenta dois estágios morfológica e bioquimicamente distintos, a forma amastigota e a forma promastigota. A forma amastigota desenvolve-se intracelularmente, multiplicando-se especialmente em macrófagos, apresentando forma arredondada e sem flagelo. No intestino do flebotomíneo, as amastigotas são liberadas e se transformam em promastigotas, as quais se apresentam na forma alongada e com um flagelo bem desenvolvido (Ashford 2000, Gontijo & Carvalho 2003). Em seguida, esta forma promastigota sofre um processo de diferenciação morfológica e funcional, passando da forma procíclica inicial, não infectante, para a forma metacíclica infectante, através da metaciclogênese (da Silva & Sacks 1987). As formas metacíclicas migram para a peça bucal do inseto, que quando faz novo repasto sanguíneo transmite o parasito para o hospedeiro (Ashford 2000). As formas promastigotas procíclicas e metacíclicas são também encontradas em culturas axênicas, representando as formas em fase de crescimento logarítmico e em fase estacionária do crescimento, respectivamente.

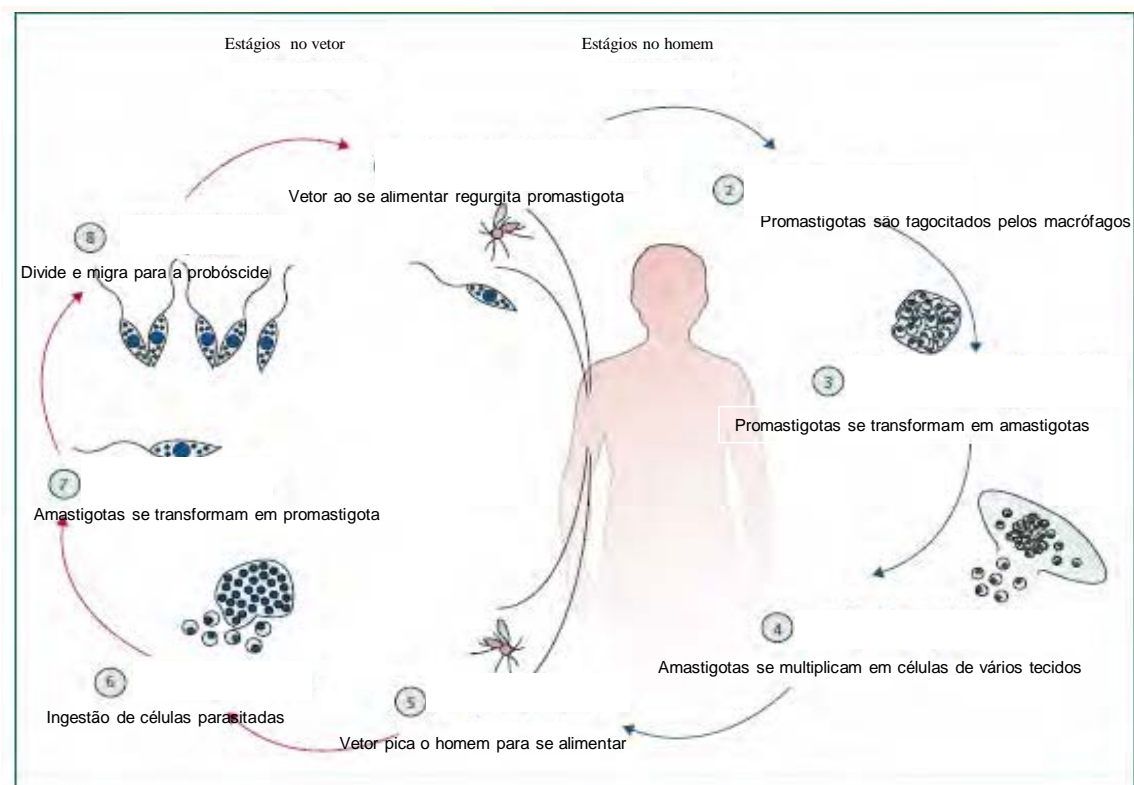


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania sp* (Adaptado de Reithinger et al. 2007)

1.2. Patogênese e manifestações clínicas

Após a picada do inseto vetor, *Leishmania sp* inoculada no hospedeiro vertebrado, na forma promastigota, é então fagocitada por diferentes células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente por macrófagos, onde se diferencia na forma amastigota, estabelecendo a infecção. A sobrevivência da forma amastigota na célula infectada depende da interação do parasito com a célula do hospedeiro e os mecanismos que o parasito utiliza para modular este processo ainda não são completamente conhecidos (Kima 2007).

Em seres humanos, as características do parasito e da resposta imune definem o amplo espectro clínico da infecção causada por *Leishmania*, variando de infecções assintomáticas e lesões cutâneas com cura espontânea até leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose visceral, além de formas cutâneas crônicas ou com acometimento de mucosa (Murray et al. 2005).

Na Figura 2 observamos o espectro clínico da leishmaniose humana através da relação entre imunidade celular (CMI), hipersensibilidade tardia (DTH) e a quantidade de parasitos. E dependendo destes fatores temos desde formas assintomáticas (1) com relação CMI/DTH equilibrada e pequena quantidade de parasitos até doença crônica (4) que se manifesta por CMI/DTH ausente ou ineficaz e grande quantidade de parasitos (leishmaniose cutâneo difusa e leishmaniose visceral) ou CMI/DTH forte com inflamação patológica apesar da pequena quantidade de parasitos (leishmaniose mucosa e cutânea crônica).

LEISHMANIOSES – FORMAS CLÍNICAS

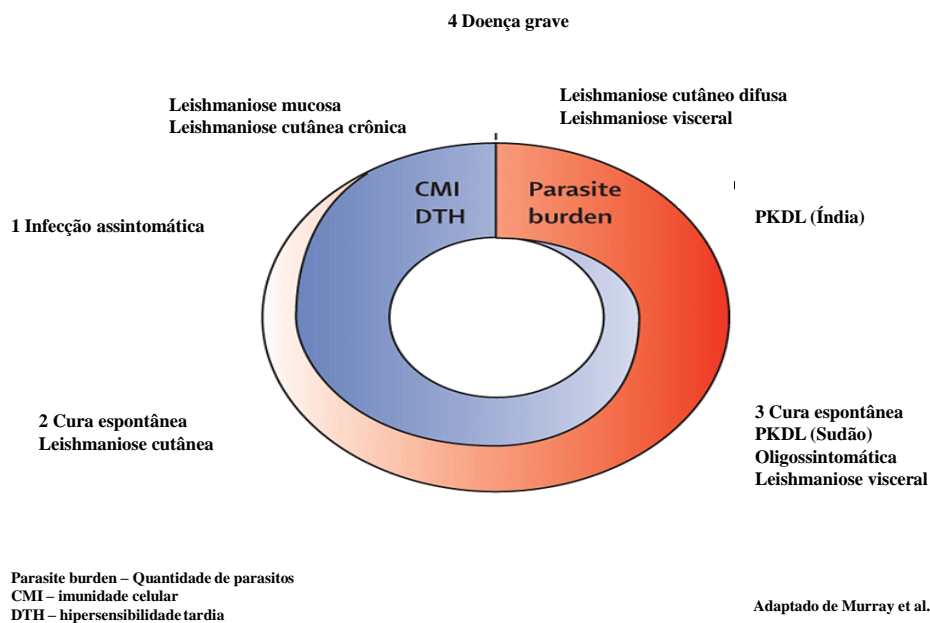


Figura 2. Espectro clínico da Leishmaniose humana. Adaptado de Murray et al. 2005

Após um período de incubação de duas semanas a três meses, a infecção cutânea pode permanecer subclínica ou no local da picada do inseto surge uma pápula ou nódulo eritematoso que evolui para úlcera e pode ser precedido ou acompanhado de aumento de um gânglio regional. A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais comum da doença com uma a 20 lesões, geralmente ulceradas ou úlcero-crostosas, em áreas descobertas do corpo. A úlcera típica é arredondada, não dolorosa e pode evoluir para

cura espontânea ou progredir para uma das diferentes formas da doença, na dependência da resposta imune e da espécie de *Leishmania* (Ministério da Saúde 2007).

A forma cutânea disseminada (LD) se caracteriza pela presença de mais de 10 lesões, geralmente acneiformes ou papulares, em duas ou mais áreas não contíguas do corpo. Em 29% dos casos pode ocorrer lesão de mucosa. *L. (V.) braziliensis* é a única espécie já isolada nos pacientes com LD. Tem sido relatado o aumento desta forma, especialmente na região nordeste do Brasil (Turetz et al 2002).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma anérgica, rara e caracterizada por lesões nodulares, ricas em parasitos, de difícil tratamento e prognóstico reservado. Tem sido relatada na América do Sul, América Central e Etiópia. As lesões são ricas em parasitos e as espécies envolvidas são *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) aethiopica* (Goto & Lindoso 2010).

A forma mucosa ou cutâneomucosa (LM ou LCM) tem incidência variando de 0,4 a 2,7% nas diversas regiões do Brasil (Jones et al. 1987, Gontijo et al. 2002, de Castro et al. 2005). Ocorre de um a cinco anos após a cura da lesão cutânea, mas pode ser concomitante ou aparecer até décadas depois. Acomete as mucosas oral, nasal, faríngea e laríngea, levando à destruição tecidual e lesões desfigurantes. Segundo Bedoya-Pacheco et al (2011) a proporção de pacientes com forma mucosa aumenta com a diminuição da prevalência da LTA, reforçando o conceito de que a LM é secundária à forma cutânea mesmo quando a lesão cutânea não é detectada ou é auto limitada.

Recentemente, novos fatores também parecem ser importantes na evolução da LM: a infecção da *Leishmania* por um vírus RNA (LRV1) endógeno que aumenta a resposta imune. Questiona - se a influência deste vírus na resposta do macrófago e na manutenção de uma resposta imune ativa, facilitando a disseminação do parasito e aumentando, conseqüentemente, a incidência de formas graves (Ives et al. 2011, Scott 2011). Os hormônios sexuais também tem sido considerados na modulação da resposta imune (Snider et al. 2009).

Em pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida, a LTA pode se manifestar durante a síndrome de reconstituição imune. Nestes casos, observa-se agravamento de lesões existentes ou reativação da infecção associada com a recuperação do número das células T CD4⁺ e redução da carga viral após o início do

tratamento antirretroviral altamente efetivo (Hirsch et al. 2004). Os pacientes apresentam lesões polimórficas, variando de pápulas, nódulos, placas e ulcerações até diferentes formas de lesões mucosas. Também foram descritas lesões genitais e a forma cutâneo difusa (Posada-Vergara et al. 2005, Sinha et al. 2008, Lindoso et al. 2009, Goto & Lindoso 2010).

1.3. Imunologia

Diferentemente da dicotomia da resposta dos linfócitos T auxiliares (Th), com perfil de respostas Th1 ou Th2 bem definidas no modelo de infecção com *L. major* em camundongos, em pacientes com LTA ocorre uma mistura da imunidade Th1 e Th2.

Em geral, os pacientes com LCL apresentam resposta imune celular contra *Leishmania*, avaliada por intradermoreação, bem como resposta imune humoral (Convit et al. 1993). Na fase ativa da LCL, há predominância de linfócitos T CD4⁺ com produção tanto de citocinas do tipo Th1 (interferon gama, IFN γ) quanto do tipo Th2 (interleucina 4, IL-4). Em indivíduos com regressão espontânea da lesão ou naqueles que apresentam cura clínica após o tratamento quimioterápico, há maior produção de IFN γ e baixos níveis de IL-4 (Coutinho *et al.* 1998). A predominância de citocinas Th1 sobre Th2 parece ser o perfil mais comumente encontrado na LCL (Cáceres-Dittmar et al. 1993, Pirmez et al. 1993, Convit et al. 1993) e o aumento do IFN γ e a diminuição do fator de necrose tumoral (TNF) parecem ser necessários para a obtenção da cura (D'Oliveira Jr et al. 2002). Também tem sido descrita uma diminuição dos níveis de IFN γ e TNF após terapia bem sucedida de LCL (Ribeiro-de-Jesus et al. 1998). Estes resultados sugerem que pacientes que produzem IFN γ e TNF, necessários para a eliminação dos parasitos, e também conseguem modular a resposta inflamatória, têm mais chance de cura. Na LCL, a expressão de NO sintase induzida (iNOS, *inducible Nitric Oxide Synthase*), a enzima responsável pela produção de NO (óxido nítrico), é encontrada nas lesões, sendo associada à expressão de interleucina 12 (IL-12) e IFN γ e à diminuída quantidade de parasitos, o que sugere um papel para o NO na defesa contra os parasitos (Qadoumi et al. 2002, Diaz et al. 2006, Morgado et al. 2008). De fato, monócitos/macrófagos humanos produzem NO e matam *L. major*, um mecanismo dependente da presença de TNF (Vouldoukis et al. 1997); por outro lado, isolados de *L. (V.) braziliensis* mais resistentes ao NO multiplicam-se mais nos macrófagos (Giudice et al. 2007). Na LCD os pacientes apresentam um perfil predominantemente do tipo

Th2, com completa anergia ao antígeno de *Leishmania*, intradermorreação negativa, baixas concentrações de IFN γ e IL-12, mas com altas concentrações de IL-4, IL-5 e TNF (Bomfim et al. 1996).

Na LM, causada especialmente por *L. (V.) braziliensis*, os pacientes apresentam forte resposta imune celular, concomitante a uma progressiva destruição tecidual. A resposta à intradermorreação com antígenos de *Leishmania* é mais forte do que a de pacientes com LCL e as concentrações de IFN, IL-2, IL-5 e TNF se apresentam mais elevadas. Nas lesões, há um intenso infiltrado inflamatório rico em linfócitos e plasmócitos, com poucos macrófagos contendo escassos parasitos. Existe uma mistura das respostas Th1 e Th2 com elevados níveis de IL-2, IL-4, IL-5 e TNF, o que explica a não resolução da doença (Convit et al. 1993, Pirmez et al. 1993, Ribeiro-Jesus et al. 1998). A maioria dos linfócitos é T CD4⁺ com perfil Th1, havendo elevada expressão de TNF nas lesões, o que pode ser acompanhado ou não da expressão de IL-4 (Cáceres-Dittmar et al. 1993, Amato et al. 2003, Silveira et al. 2004). A expressão de iNOS nas lesões de pacientes com LCM parece ser similar àquela de pacientes com LCL (Diaz et al. 2006). Não existem marcadores imunológicos que possam identificar os pacientes com LCL que apresentam risco de desenvolver a forma mucosa da leishmaniose (Barral-Netto et al. 1995).

Embora ocorra a produção de IFN durante a infecção por *L. (V.) braziliensis*, necessária para o controle da infecção, não está claro porque os pacientes desenvolvem a doença. É possível que ocorra alguma anormalidade no local da lesão com evidência de um padrão misto Th0 ou Th1/Th2. Algumas diferenças foram encontradas no perfil de citocinas em pacientes com lesões recentes (IFN γ e IL-10) quando comparados com aqueles com lesões antigas (TNF). Em casos de LV e LCD, a ausência de IFN γ permite a multiplicação dos parasitos e a progressão da doença. Portanto, presume-se que a resposta de célula T e a função dos monócitos sejam importantes para o controle da Leishmaniose (Ribeiro-de-Jesus et al. 1998).

1.4. Diagnóstico

O diagnóstico da LTA baseia-se em dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. A confirmação laboratorial deve ser preferencialmente por meio do encontro do parasito ou seu antígeno em amostra obtida da lesão. Quando não se

consegue evidenciar o agente etiológico, os testes imunológicos podem auxiliar no diagnóstico.

A pesquisa de formas amastigotas em amostras obtidas através de raspado, *imprinting* ou biópsia da lesão, coradas pelo Giemsa, tem sensibilidade de 15 a 30%, chegando a 44 - 58% quando se associa a cultura em meio de Novy, McNeal e Nicolle e a 38 - 52% com a inoculação em hamster. A imunoistoquímica, realizada em fragmentos de biópsia, pode evidenciar a forma amastigota ou seu antígeno em até 88,5% quando se usa imunofluorescência e em 58,6 a 64,5% com a técnica da imunoperoxidase (Oliveira et al. 2010). Assim, os métodos utilizados para a detecção do parasito têm baixa sensibilidade e não identificam as espécies de *Leishmania*. Detecção do DNA da *Leishmania* através da reação em cadeia da polimerase (PCR), além de ter a mesma sensibilidade dos métodos parasitológicos para evidenciar o parasito, também identifica a espécie, é específico, rápido e pode ser usado em diferentes amostras biológicas (Sotto et al. 1989, Schubach et al. 2001, Weigle et al. 1987, Reithinger et al. 2007). A PCR em tempo real, usando iniciadores específicos para gêneros e espécies de *Leishmania*, tem sido avaliada recentemente, com resultados promissores quando comparada à técnica convencional (Castilho et al. 2008, Antinori et al. 2009).

Os testes imunológicos utilizados na prática clínica são indicadores indiretos da infecção por *Leishmania*. São comumente utilizados a intradermoreação de Montenegro e exames sorológicos. O teste de Montenegro indica infecção por *Leishmania*, mas não distingue se a infecção é presente ou passada, assim sua importância diagnóstica fica prejudicada para pacientes oriundos de áreas endêmicas, pois, indivíduos assintomáticos podem apresentar teste positivo (Goto et al. 2010). Em pacientes tratados, a intradermoreação de Montenegro permanece positiva ainda por tempo indeterminado, sendo que em casos de infecção por *L. major* foi observada positividade por mais de 19 meses após o tratamento (Sassi et al. 1999). O teste de Montenegro encontra-se positivo em mais de 80% dos pacientes com LCL, LD e LM, enquanto que na LCD é persistentemente negativo (Costa et al. 1986, Reis et al. 2009).

Os exames sorológicos, mais comumente utilizados, são a imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), que têm sensibilidade baixa, exceto na forma mucosa, e apresentam variação de acordo com a espécie. Quando positivos

geralmente indicam infecção e os níveis tendem a cair após o tratamento (Romero et al. 2005, Barroso-Freitas et al. 2009).

1.5. Tratamento

O tratamento da LTA depende da espécie de *Leishmania*, forma clínica e comorbidades. Os antimoniais pentavalentes são os fármacos de primeira linha. Eles aumentam a capacidade fagocítica dos neutrófilos, com o aumento da produção de superóxido e, portanto, podem destruir o parasito por mecanismos diretos e indiretos (Muniz-Junqueira et al. 2008).

Como alternativas, são recomendadas a anfotericina B na forma de desoxicolato ou nas formulações lipídicas, especialmente a lipossomal e a pentamidina. Outros fármacos como azitromicina, allopurinol em associação com antimoniais, dapsona, rifampicina, imidazóis e miltefosine também tem sido utilizados. O uso tópico de paramomicina tem se mostrado promissor assim como calor e mais recentemente a terapia fotodinâmica associada ao uso de antimoniais (Arana et al. 2001, Soto et al. 2004, Lima et al. 2007, van der Snoek et al. 2008). Ainda em fase experimental, o tamoxifeno tem sido usado, entre outros (Miguel et al. 2009).

A imunoterapia, utilizando antígeno *Leishmania*, isolado ou em associação com outros antígenos, como o BCG, pode ser indicada em situações especiais, quando os pacientes apresentam baixa resposta imune ao parasito. O uso de vacinas com preparações de formas promastigotas tem mostrado resultados promissores (Mayrink et al. 1992, Convit et al. 2003). E a imunoterapia associada com antimoniais tem sido uma alternativa para tratamento de casos graves e refratários aos tratamentos convencionais (Musa et al. 2010). O uso de imunomoduladores como a pentoxifilina, interferon e imiquimod associados aos antimoniais também são promissores (Arana et al. 1994, Miranda-Verastegui et al. 2005, Machado et al. 2007).

2. Os monócitos do sangue periférico humano: participação na Leishmaniose Tegumentar Americana

Os monócitos são células mielóides, que se originam de precursores na medula óssea, circulam pelo sangue e, ao migrarem para os tecidos, diferenciam-se em

macrófagos ou em células dendríticas. Os monócitos são células da imunidade natural, conhecidos como fagócitos mononucleares, que desempenham diversas funções no desenvolvimento de homeostasia, na defesa contra agentes infecciosos, tumores, inflamação, ativação de linfócitos T e reparo tecidual (Auffray et al. 2009, Serbina et al. 2008). O elevado número de atividades e plasticidade dos monócitos levou a estudos sobre sua heterogeneidade populacional, que culminaram na divisão dos monócitos em subpopulações. Assim, no sangue periférico humano, três subpopulações de monócitos foram definidas, tendo sido assumida uma nova nomenclatura a partir de 2010, adotada pela União Internacional das Sociedades de Imunologia (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). A nova divisão baseia-se na expressão e na intensidade da expressão de dois marcadores, o CD14 e o CD16. Em condições fisiológicas podem ser detectados: os monócitos clássicos, que expressam muito CD14 e não expressam o CD16 ($CD14^{high}CD16^{-}$), os intermediários, que expressam muito CD14 e CD16 ($CD14^{high}CD16^{+}$) e os não clássicos, que diminuem a expressão de CD14, mantendo uma elevada expressão de CD16 ($CD14^{low}CD16^{++}$) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). O CD14 é um co-receptor do TLR4 (*Toll*-like receptor 4, receptor similar a *Toll*, 4), que é o receptor do lipopolissacarídeo (LPS) de certas bactérias Gram negativas, e o CD16 é o receptor de baixa afinidade para a imunoglobulina G (FcRIII), utilizado para a eliminação de imunocomplexos pelos monócitos (Martinez 2009). Quando for avaliada apenas a presença ou ausência de CD16 nos monócitos, a nomenclatura sugerida é a de monócitos $CD16^{+}$ e $CD16^{-}$, referindo-se a todos os monócitos $CD14^{+}$ (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).

Inicialmente, foi descrito que 90% dos monócitos clássicos do sangue expressavam a molécula CD14 em grande intensidade ($CD14^{++}$ ou $CD14^{hi}$) e não expressavam CD16 ($CD16^{-}$). Além destes, cerca de 10% dos monócitos expressavam baixas quantidades de CD14 e apresentavam o CD16 ($CD14^{+}CD16^{+}$ ou $CD14^{lo}CD16^{+}$), hoje considerados os monócitos não clássicos (Ziegler-Heitbrock et al. 1992, Fingerle et al. 1993, Ziegler-Heitbrock 1996). Vários estudos, além destes acima citados, foram realizados nas décadas de 1990 e 2000, considerando apenas estas duas subpopulações, divididas também em monócitos $CD16^{+}$ ou $CD16^{-}$ (Fingerle-Rowson et al. 1998, Belge et al. 2002, Randolph et al. 2002, Iwahashi et al. 2004, Yano et al. 2007, Ziegler-Heitbrock 2007, Serbina et al. 2009). Posteriormente, a subpopulação $CD16^{+}$ foi subdividida em duas, compondo os monócitos intermediários e os não clássicos. Cerca

de 90% dos monócitos são clássicos e os 10% restantes são subdivididos em intermediários e não clássicos, sendo os intermediários encontrados em menor porcentagem (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).

A avaliação das características fenotípicas e funcionais das subpopulações dos monócitos sugeriu que estas subpopulações são parte de um contínuo processo de desenvolvimento dos monócitos, sendo os monócitos clássicos ($CD14^{hi}CD16^{-}$) os mais imaturos, passando para o estágio intermediário de maturação (monócitos intermediários $CD14^{hi}CD16^{+}$) e os mais maduros são os monócitos não clássicos ($CD14^{lo}CD16^{+}$). Quando os monócitos não clássicos foram descobertos, demonstrou-se que eles apresentavam características fenotípicas e funcionais similares a macrófagos teciduais (macrófagos alveolares, micróglia), ou seja, sendo $CD14^{lo}CD11b^{lo}CD33^{lo}CD16^{+}MHCII^{+}$ (MHCII, moléculas classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade, *Major Histocompatibility Complex*), expressando TNF, mas não IL-10, após estimulação com LPS. Por estas características, acreditou-se que os monócitos $CD14^{lo}CD16^{+}$ fossem mais maduros do que os monócitos clássicos (Ziegler-Heitbrock et al. 1993, Frankenberger et al. 1996). Também foi demonstrado que os monócitos clássicos podem ser convertidos em monócitos não clássicos, tanto por ação de citocinas quanto por estímulos microbianos, especialmente pela diminuição da expressão do CD14 e aumento de CD16 (Li et al. 2004, Skinner et al. 2005). Recentemente, o tratamento de pacientes com artrite reumatóide com anticorpos anti-fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) mostrou que há uma queda nos monócitos intermediários e não clássicos e que, após a retirada da terapia, os primeiros monócitos $CD16^{+}$ que se recuperaram foram os intermediários, seguidos pelos não clássicos. Esta foi a primeira evidência de que o M-CSF, em condições fisiológicas, é importante para a diferenciação dos monócitos intermediários e não clássicos (Korkosz et al. 2012).

As análises genômicas confirmaram a existência das três subpopulações dos monócitos no sangue humano (Cros et al. 2010, Wong et al. 2011, Zawada et al. 2011) e tem auxiliado na demonstração de evidências de que as subpopulações são estágios diferenciais de desenvolvimento dos monócitos. Estes trabalhos mostram claras diferenças entre as subpopulações, porém, enquanto Cros et al (2010) mostraram que as subpopulações de monócitos clássicos e intermediários estão mais próximas, Wong et al. (2011) e Zawada et al. (2011) demonstraram uma maior proximidade entre os

monócitos intermediários e não clássicos. Estes dois últimos trabalhos mostram que os genes mais expressos pelos monócitos intermediários estão em níveis intermediários entre os monócitos clássicos e não clássicos.

As subpopulações de monócitos expressam alguns genes que lhes conferem diferenças fenotípicas e funcionais. Algumas características são específicas a cada subpopulação, outras são compartilhadas em menor ou maior grau. Há diferenças quanto a expressão de receptores para antígenos, quimiocinas e citocinas, de moléculas de adesão e de receptores acoplados a proteína G. Os monócitos clássicos expressam especialmente CCR2, um receptor para as quimiocinas CCL2, CCL7, CCL8 e CCL13 (antigas MCP-1,2,3,4, *monocyte chemokine protein*), enquanto os não clássicos expressam mais CX3CR1, um receptor para a quimiocina CX3CL1 (*fractalkine*). Os monócitos clássicos apresentam alta expressão de genes associados ao reparo tecidual (angiogênese, cicatrização e coagulação) e a propriedades anti-apoptóticas. Já os monócitos intermediários expressam mais moléculas associadas à apresentação de antígenos aos linfócitos T, tais como moléculas MHC II, CD74 e CD40, portanto, podendo ter uma função de célula apresentadora de antígenos mais proeminente que as outras subpopulações de monócitos. Os monócitos não clássicos expressam genes envolvidos no rearranjo do citoesqueleto, que lhes conferem mais motilidade e a característica de serem células em íntimo contato com o endotélio, fazendo um exame contínuo do mesmo, bem como confere capacidade de fagocitose (também associada à maior expressão de CD16 e receptores para o complemento). Estes monócitos expressam mais genes associados a propriedades anti-proliferativas, pro-apoptóticas (Cros et AL. 2010, Wong et al. 2011, Zawada et al. 2011, Abeles et al. 2012).

Os monócitos permanecem poucos dias no sangue, migrando para os tecidos, onde se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas. Os monócitos não clássicos têm elevado potencial para converterem-se em células dendríticas migratórias, com alta expressão de CD86 e MHCII e capacidade de induzir reação linfocitária mista, características induzidas pelo TGF β (Randolph et al. 2002). Monócitos não clássicos ativados por IL-10/M-CSF/IL-4 também possuem maior capacidade de indução de reação linfocitária mista que os monócitos clássicos (Li et al. 2004). Porém, como a IL-10 diminui a expressão de marcadores de células dendríticas e aumenta a expressão de CD16, tem sido sugerido que o TGF β induziria geração de células dendríticas nos tecidos, a partir dos monócitos não clássicos, enquanto a IL-10 induziria geração de

macrófagos CD16⁺ nos tecidos (Randolph et al. 2002). A expressão dos marcadores CD14 e CD16 é variada nos macrófagos teciduais, por exemplo, enquanto os macrófagos peritoneais são CD14^{hi}CD16^{lo}, os macrófagos alveolares são CD14^{lo}CD16^{hi} (Ziegler-Heitbrock 1996). Se durante um processo inflamatório, os macrófagos CD14^{lo}CD16^{hi} são expandidos localmente ou oriundos dos monócitos clássicos por meio de ativação local, ainda necessita mais estudos. Porém, foi demonstrado que os monócitos não clássicos, que vivem em íntimo contato com o endotélio, podem chegar rapidamente aos tecidos, participando tanto da reposição fisiológica de macrófagos teciduais quanto do aumento de macrófagos nos processos inflamatórios (Cros et al. 2010).

Não há um consenso em relação às citocinas produzidas preferencialmente pelas subpopulações de monócitos. A produção de citocinas depende da via de ativação das células. As diferentes subpopulações de monócitos fazem parte do sistema imune natural ou inato, no qual os TLRs são essenciais para o reconhecimento de patógenos, sendo que o TLR2 e o TLR4 são acionados por lipoproteínas de bactérias Gram positivas e LPS de bactérias Gram negativas, respectivamente. Já os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são responsáveis pelo reconhecimento de ácidos nucleicos, como RNA de fita simples ou dupla e CpG DNA não metilado. Tais receptores consistem em um grupo de proteínas transmembrânicas presentes nas células da imunidade natural, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas e polimorfonucleares. Os TLRs medeiam a sinalização para a produção de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias (Brightbill et al. 1999, Albiger et al. 2007, Cros et al. 2010). As diferentes subpopulações de monócitos podem responder diferencialmente a produtos bacterianos (monócitos CD14^{hi}CD16⁻ ou CD14^{hi}CD16⁺⁺) e virais (monócitos CD14^{lo}CD16⁺⁺), via diferentes TLRs, para a produção de citocinas pró e antiinflamatórias (Cros et al. 2010). Os estudos com separação das subpopulações para avaliação das citocinas mostram resultados divergentes. Enquanto Cros et al. (2010) mostraram que os monócitos não clássicos não apresentam boa resposta a LPS, sendo pouco produtores de TNF, IL-1 β e IL-10, Wong et al. (2011) mostraram que estas células são as principais produtoras de TNF e IL-1 β após ativação com LPS. Estes últimos resultados estão de acordo com estudos prévios de expressão de TNF intracelular em monócitos não clássicos ativados com LPS (Belge et al. 2002). O trabalho de Wong et al. (2011) não confirmou os resultados de Skrzeczynska-Moncznik et al. (2008) que apontaram os monócitos

intermediários como os principais produtores de IL-10. Em contraste, Wong et al. (2011) mostraram que os monócitos clássicos são os principais produtores de IL-10, após ativação com LPS. Também foi demonstrado que o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) converte monócitos CD14^{hi} em CD14^{lo} produtores de IL-10 e indutores de tolerância em linfócitos T CD4⁺ (Ganguly et al. 2007). Parece que várias subpopulações de monócitos podem apresentar distintos perfis de produção de citocinas após ativação via TLR2 ou TLR4 (Smedan et al. 2011).

Os monócitos não clássicos estão aumentados no sangue periférico de pacientes com doenças inflamatórias tais como a artrite reumatóide, aterosclerose e doença de Kawasaki (Ziegler-Heitbrock 2007). Na artrite reumatóide, monócitos não clássicos estão aumentados no sangue e no fluido sinovial dos pacientes, correlacionando com a atividade da doença (Baeten et al. 2000, Kawanaka et al. 2002). Estes monócitos expressam mais TLR2 do que os monócitos clássicos, tanto em indivíduos saudáveis (Belge et al. 2002), quanto em pacientes com artrite (Iwahashi et al., 2004). Nos pacientes, tanto os monócitos CD16⁺ quanto os macrófagos sinoviais CD16⁺ expressam altos níveis de TLR2 e em resposta a um agonista deste receptor produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Iwahashi et al. 2004). De fato, a estimulação com agonista de TLR2 também induz elevada produção de TNF em hemoculturas, sendo este TNF oriundo principalmente da subpopulação de monócitos não clássicos (Belge et al. 2002).

Além de estarem aumentados em condições inflamatórias, os monócitos não clássicos também aumentam durante o curso de algumas infecções, tanto infecções localizadas quanto na sepse (Ziegler-Heitbrock 2007). Na tuberculose e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*) há uma expansão dos monócitos não clássicos, que no caso da infecção por HIV está associada à demência (Thieblemont et al. 1995, Ziegler-Heitbrock 2007). Foi demonstrado também que a subpopulação CD14^{hi}CD16⁺ (monócitos intermediários) é a principal subpopulação de monócitos associada ao aumento da gravidade da infecção por HIV (Han et al. 2009). Ainda em pacientes com tuberculose, recentemente foi demonstrado um aumento também na subpopulação dos monócitos intermediários, além dos não clássicos (Castaño et al. 2011). Em pacientes com sepse, os monócitos não clássicos são encontrados em números elevados e parecem ser os maiores produtores de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF e a IL-6 (Fingerle et al. 1993, Skinner et al. 2005).

Produtos microbianos, bem como o TNF, podem contribuir para aumentar o número de monócitos não clássicos durante a sepse (Skinner et al. 2005). Também na forma leve de dengue foi demonstrado um aumento dos monócitos intermediários (Azeredo et al. 2010). Em todos os trabalhos, a expansão durante as infecções, bacterianas ou virais, é dos monócitos intermediários ou não clássicos, ou seja, os que expressam CD16 (Wong et al. 2012).

Na LTA, na forma LCL, foi demonstrado que os pacientes apresentam um elevado número de monócitos CD14⁺CD16⁺ (todos os monócitos CD16⁺) e uma maior intensidade de expressão do CD16 nestes monócitos, quando comparados com controles sadios (Soares et al. 2006). Neste estudo, foi demonstrada uma correlação entre o número dos monócitos CD16⁺ e o tamanho da lesão ao diagnóstico, bem como com os níveis plasmáticos de TGFβ. Em dois pacientes que não curaram as lesões, em três anos de tratamento, o número de monócitos CD16⁺ foi muito elevado, sugerindo presença de monócitos CD16⁺ na doença grave.

Em todas as doenças citadas acima, a expansão das subpopulações de monócitos CD14⁺ expressando CD16 parece estar associada ao processo inflamatório e à gravidade da doença. Mais estudos são necessários para avaliar a participação das diferentes subpopulações de monócitos na LTA.

JUSTIFICATIVA

Apesar dos vários estudos sobre a imunologia da LTA, os mecanismos que levam ao controle ou à persistência dos parasitos ainda são obscuros, especialmente com relação à infecção causada por *L. (V.) braziliensis*, que pode culminar na cura clínica das lesões ou no desenvolvimento de lesões inflamatórias crônicas destrutivas. Ainda, também são pouco conhecidos os mecanismos de controle da infecção causada por *L. (L.) amazonensis*, especialmente na forma LCD, onde não há uma eficiente resposta imune celular adquirida.

Em várias doenças inflamatórias, infecções bacterianas e virais já foi evidenciado que a expansão das subpopulações de monócitos CD14⁺ expressando CD16 parece estar associada ao processo inflamatório e à gravidade da doença. Portanto um desequilíbrio entre as subpopulações de monócitos circulantes poderia estar envolvido na imunopatogenia da LTA. Além disto, o desequilíbrio destas subpopulações de monócitos poderia ser causa ou mesmo consequência do ambiente inflamatório gerado durante a infecção. E os monócitos poderiam servir como marcadores de inflamação ou do controle da infecção.

Uma avaliação de subpopulações de monócitos na LCD ainda não havia sido realizada e a avaliação simultânea das três subpopulações de monócitos na LTA é muito importante, pois, o equilíbrio entre elas pode ser crucial para o controle ou a manutenção/gravidade da infecção causada por *Leishmania* sp.

E finalmente o conhecimento da resposta imune será útil para o desenvolvimento de novas práticas terapêuticas, diagnósticas e preventivas com o objetivo de aliviar o sofrimento dos pacientes.

OBJETIVOS

Geral: Avaliar a participação dos monócitos na imunidade natural da Leishmaniose Tegumentar Americana.

Específicos:

Artigo 1:

- Descrever um caso clínico de leishmaniose cutâneo difusa com cura clínica, após terapia com vacinas monovalentes (*L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*) mais BCG e quimioterapia.
- Avaliar uma possível participação de monócitos CD14⁺CD16⁺ e de células NK na cura clínica transitória do paciente.

Artigo 2:

- Avaliar as proporções de subpopulações de monócitos, bem como o equilíbrio entre as citocinas pro-inflamatória TNF e antiinflamatória IL-10 na LCL e investigar a associação destas citocinas com a gravidade da LCL, para isto:
 - a) Avaliar as proporções das diferentes subpopulações de monócitos CD14^{hi}CD16⁻, CD14^{hi}CD16⁺ e CD14^{lo}CD16⁺ no sangue periférico de pacientes com LCL, antes do tratamento, comparando-as com aquelas de indivíduos saudáveis;
 - b) Avaliar a expressão das citocinas TNF e IL-10, induzidas ou não por LPS/TLR4, nos monócitos CD14⁺ do sangue periférico de pacientes com LCL, antes do tratamento, comparando as respostas com aquelas de indivíduos saudáveis;
 - c) Avaliar a produção de TNF e IL-10 em culturas de sangue periférico de pacientes com LCL, antes do tratamento, estimuladas com antígenos de *L. (V.) braziliensis* ou agonistas de TLR2 e TLR4, comparando as respostas com aquelas de indivíduos saudáveis e investigando a correlação entre as concentrações destas duas citocinas;
 - d) Avaliar a correlação entre os níveis de citocinas, produzidas após diferentes estímulos, e o número de lesões dos pacientes com LCL.

**ARTIGO 1 – Increase of NK Cells and Proinflammatory Monocytes
Are Associated with the Clinical Improvement of Diffuse Cutaneous
Leishmaniasis after Immunochemotherapy with BCG/ Leishmania
Antigens: a case report.**

Ledice I. A. Pereira, Miriam L. Dorta, Ana Joaquina C. S. Pereira, Rosidete P. Bastos, Milton A. P. Oliveira, Sebastião A. Pinto, Hélio Galdino Jr, Wilson Mayrink, Warly Barcelos, Vicente P. C. P. Toledo, Gloria Maria C. A. Lima and Fátima Ribeiro-Dias.

Publicado: *Am J Trop Med Hyg*, September 2009, 81(3): 378-383. www.ajtmh.org

ARTIGO 2 – Alterações nas subpopulações de monócitos e desequilíbrio entre as citocinas fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 10 (IL-10) na leishmaniose cutânea localizada.

Ledice I. A. Pereira^a, Hélio Galdino Jr.^a, Ildefonso Alves da Silva Jr.^a, Camila I. Morato^a, Anna Karoline A. Fleuri^a, Sebastião Alves Pinto^b, Miriam L. Dorta^a, Milton A. P. Oliveira^a, Fátima Ribeiro-Dias^{a,*}.

^aInstituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N – Setor Universitário, 74605-050, Goiânia, Goiás, Brasil. mledorta@gmail.com; mapoliv@usp.br; karoline.af@gmail.com; ledicepereira@gmail.com; fatimardias@gmail.com

^bFaculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás e Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH), Rua 87, N. 598, Setor Sul, 74093-300, Goiânia, Goiás, Brasil. sebastiaoap@ingoh.com.br

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

RESUMO

A imunidade adquirida tem sido bastante estudada na leishmaniose tegumentar americana, mas a participação da imunidade natural no controle e na imunopatogenia desta doença tem sido pouco avaliada. Os monócitos, importantes células da imunidade natural, precursores de macrófagos, estão presentes no sangue periférico humano compondo três subpopulações definidas pelos marcadores CD14 e CD16, com características fenotípicas e funcionais distintas. São as principais células produtoras de citocinas em hemoculturas, as quais permitem uma rápida e eficiente avaliação dos monócitos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a distribuição das subpopulações de monócitos do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL) e a produção de citocinas pro- (fator de necrose tumoral, TNF) e antiinflamatória (interleucina 10, IL-10), após ativação de hemoculturas com agonistas de receptores similares a *Toll* (TLR2, TLR4) ou antígeno de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Sangue de pacientes e controles, pareados por gênero e idade, foi avaliado por citometria de fluxo para determinar as frequências das subpopulações de monócitos (anticorpos anti-CD14 e anti-CD16); hemoculturas foram ativadas com LPS (agonista de TLR4), Pam₃Cys (agonista de TLR2) ou antígeno de *L. (V.) braziliensis* (Ag) por 6 h (TNF) ou 24 h (IL-10), sendo os sobrenadantes avaliados para as concentrações das citocinas, usando ELISA. Foi detectado um significativo aumento dos monócitos CD16⁺, tanto CD14^{lo}CD16⁺ (monócitos não clássicos), quanto CD14^{hi}CD16⁺ (monócitos intermediários) no sangue dos pacientes. Após ativação com LPS, ocorreu uma diminuição das porcentagens destas subpopulações, tanto nas hemoculturas de pacientes quanto nas dos controles, sem diferenças significantes entre estes dois grupos. A ativação com LPS induziu a expressão de TNF e IL-10 nos monócitos CD14⁺, não sendo atestadas diferenças significantes entre pacientes e controles. No entanto, a secreção de TNF, mas não de IL-10, nas hemoculturas dos pacientes foi mais elevada do que nas hemoculturas dos controles, especialmente após ativação com LPS ou Ag. As concentrações de TNF e IL-10 foram positivamente correlacionadas nas hemoculturas dos controles ativadas com LPS, Pam₃Cys ou Ag. Nas hemoculturas dos pacientes, no entanto, a ativação com LPS ou Ag não levou a uma produção de TNF e IL-10 positivamente correlacionadas. A elevada produção de TNF foi associada a um maior número de lesões dos pacientes. Os resultados sugerem que alterações sistêmicas nas subpopulações de monócitos e um desequilíbrio na produção de citocinas pro- e antiinflamatória estão associados a uma maior gravidade da LCL.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo *Leishmania (Viannia) braziliensis* a espécie mais prevalente no Brasil. As características do parasito e da resposta imune do hospedeiro definem as várias manifestações clínicas da infecção, que variam desde infecções assintomáticas, lesões cutâneas localizadas ou disseminadas até o acometimento de mucosa nasal ou orofaríngea (Convit et al. 1993, Gontijo & Carvalho 2003).

Na Leishmaniose cutânea localizada (LCL) os pacientes apresentam resposta imune celular à *Leishmania*, bem como resposta imune humoral (Convit et al. 1993). A

predominância de citocinas Th1 (linfócitos T auxiliares 1, citocina: interferon gama ou IFN γ) sobre Th2 (linfócitos T auxiliares 2, citocina: interleucina 4 ou IL-4) parece ser o perfil mais comumente encontrado nas lesões (Cáceres-Dittmar et al. 1993, Pirmez et al. 1993, Silveira et al. 2004). Citocinas do tipo Th1 são necessárias para a ativação dos macrófagos e eliminação dos parasitos, enquanto citocinas Th2 são inibidoras dos macrófagos, contribuindo para a multiplicação dos parasitos (Reithinger et al. 2007). O aumento da produção de IFN γ e a diminuição do fator de necrose tumoral (TNF) e das citocinas reguladoras interleucina 10 (IL-10) e IL-4 parecem ser necessários para a obtenção da cura clínica da LCL (Ribeiro-de-Jesus et al. 1998, Castellano et al. 2010). Recentemente, foi relatada uma associação entre os níveis de TNF, em culturas de células mononucleares incubadas com antígeno de *Leishmania*, e a gravidade da LTA na sua forma LCL (Oliveira et al. 2011).

A maioria dos dados sobre a imunidade e a imunopatogênese da LTA vêm de estudos da resposta imune adquirida, havendo muito ainda a ser esclarecido sobre a imunidade natural, especialmente sobre os monócitos, os precursores dos macrófagos, que são as células hospedeiras do parasito *Leishmania*. Os monócitos são produzidos na medula óssea, circulam no sangue e migram para os tecidos, onde se convertem em macrófagos ou células dendríticas, podendo influenciar diretamente a resposta imune ou a patogênese das doenças (Auffray et al. 2008, Serbina et al. 2008). Recentemente, foi estabelecido que, em condições fisiológicas, podem ser detectadas três subpopulações de monócitos no sangue periférico humano: os clássicos (CD14^{hi}CD16⁻, cerca de 90% dos monócitos), os intermediários (CD14^{hi}CD16⁺) e os não clássicos (CD14^{lo}CD16⁺) (Van de Veerdonk & Netea 2010, Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Estas subpopulações representam diferentes estágios de maturação dos monócitos, sendo os clássicos os mais imaturos e os não clássicos, os mais maduros (Wong et al. 2011, Zawada et al. 2011). As diferentes subpopulações de monócitos diferem quanto à expressão de receptores para citocinas, quimiocinas e antígenos, quanto a moléculas de adesão e receptores acoplados a proteína G. Estas células podem responder diferencialmente a produtos bacterianos e virais, via diferentes receptores similares a *Toll* (TLRs), para a produção de citocinas pró- e antiinflamatórias (Cros et al. 2010, Wong et al. 2011, Zawada et al. 2011). Embora não haja um consenso em relação à produção de citocinas pelas diferentes subpopulações de monócitos (Belge et al. 2002, Skrzecynska-Moncznik et al. 2010, Cros et al. 2010, Smedman et al. 2011, Wong et al. 2011) parece que os monócitos não

clássicos são os maiores produtores de TNF, enquanto os clássicos seriam os que produzem maiores quantidades de IL-10, após estimulação com LPS (Belge et al. 2002, Wong et al. 2011). Um desequilíbrio nas proporções destas diferentes subpopulações de monócitos pode ser a causa da eliminação ou da progressão de doenças.

Em algumas infecções foi demonstrada a alteração das subpopulações dos monócitos, associando as alterações das frequências das diferentes subpopulações com formas mais brandas ou mais graves das doenças. A subpopulação de monócitos intermediários CD14^{hi}CD16⁺ é associada ao aumento da gravidade da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (Han et al. 2009) e na forma clássica de dengue esta subpopulação de monócitos está aumentada (Azeredo et al. 2010). Em pacientes infectados com *Mycobacterium tuberculosis* há aumento dos monócitos intermediários e não clássicos (Castaño et al. 2011). Diferenças nas proporções e funções das subpopulações de monócitos intermediários e não clássicos também tem sido descritas nas diferentes formas clínicas da malária (Ogonda et al. 2010). Na LCL, foi demonstrado que os pacientes apresentam um elevado número de monócitos CD16⁺ e uma maior intensidade de expressão do CD16 nestes monócitos, quando comparados com controles sadios, sugerindo uma associação entre aumento de monócitos CD16⁺ e a gravidade da doença (Soares et al. 2006). No entanto, em um caso de leishmaniose cutânea difusa (causada por *L. (L.) amazonensis*), o tratamento do paciente com BCG (Bacilo Calmette Guérin) e Leishvacin® aumentou a frequência de monócitos não clássicos CD14^{lo}CD16⁺, associada com a melhora clínica (Pereira et al. 2009). Uma investigação sobre a distribuição das diferentes subpopulações de monócitos na LCL pode auxiliar na elucidação da participação dos monócitos na imunopatogenia ou no controle da infecção por *Leishmania*.

O objetivo do presente estudo foi avaliar as proporções de subpopulações de monócitos, bem como o equilíbrio entre as citocinas pro-inflamatória TNF e antiinflamatória IL-10 na LCL. Os monócitos são muito sensíveis a estímulos, podendo apresentar alterações funcionais quando técnicas de purificação são utilizadas, portanto, neste estudo, o ensaio de hemocultura foi escolhido por permitir a avaliação dos monócitos do sangue sob mínimas condições de alteração de suas funções (Damsgaard et al. 2009). Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de análise de citocinas em hemoculturas de pacientes com LTA.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes e controles: Todos os procedimentos do presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (protocolo 164/08), sendo que pacientes e doadores sadios leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de participarem da pesquisa. Foram incluídos 32 pacientes diagnosticados com LCL, bem como 32 controles sadios, pareados por gênero e idade (26 homens e seis mulheres, com idade entre 18 e 65 anos). Devido a algumas perdas de resultados por falhas técnicas, o número de amostras (n) varia nos resultados dos diferentes experimentos. O diagnóstico foi baseado nos dados epidemiológicos e exame clínico, associados com a positividade de um dos exames laboratoriais: intradermorreação de Montenegro (IRM), análise histopatológica, com detecção de formas amastigotas confirmadas por imunistoquímica, e reação de imunofluorescência indireta. Para a caracterização molecular do subgênero de *Leishmania* nos fragmentos de biópsias das lesões, foi utilizada a reação da polimerase em cadeia (PCR_RFLP), de acordo com Passos et al. (1996) e Volpini et al. (2004). Foram excluídos pacientes com idade inferior a 18 anos ou superior a 65 anos, ou aqueles com história de uso da medicação específica nos últimos três meses. Os pacientes foram atendidos no ambulatório de Endemias do HDT/Hospital Anuar Auad, Centro de referência de leishmanioses no Estado de Goiás, para diagnóstico clínico, obtenção da biópsia e sangue, tratamento e acompanhamento. Os controles sadios foram recrutados no Banco de Sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH). Após o diagnóstico, os pacientes foram tratados, sendo o fármaco de primeira escolha, o antimonial pentavalente (antimoniato de N-metil glucamina, Glucantime, Aventis, SP, Brazil; 20 mg/kg/dia/30 dias) e de segunda escolha, a anfotericina B (Anforicin B, Cristália, SP, Brazil; dose total de 1.500 a 2.000 mg) e seguidos por até 12 meses.

Amostras de sangue periférico: Para obtenção de soro foram colhidos 4 mL de sangue periférico e para realizar a hemocultura foram também colhidos 4 mL do sangue periférico dos pacientes e dos indivíduos sadios, em tubos vacutainer (BD Vacutainer™, Juiz de Fora, MG, Brasil) sem ou com solução de heparina como anticoagulante. O sangue dos pacientes foi colhido após a confirmação do diagnóstico. Os leucócitos totais e monócitos foram quantificados usando solução de lise de hemácias (líquido de Turk) e contagem em hematocitômetro, sendo os resultados expressos em células/mm³.

Obtenção dos antígenos de *L. (V.) braziliensis*: Após cultivo do isolado de *L. (V.) braziliensis* IMG3 (*Leishbank*, Banco de leishmanias da região Centro-Oeste, IPTSP/UFG), por seis dias em meio Grace completo (Grace's Insect Medium, Sigma Chemical Co, St Louis, MD, EUA), suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SBF, Cripion, Andradina, SP, Brasil), 2 mM de L-Glutamina (Sigma), 11 mM de bicarbonato de Sódio (Merck), 100U/mL de penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), os parasitos foram lavados em solução salina três vezes, centrifugando a 100g por 15 min, a 10°C. O sedimento foi ressuscitado em salina (NaCl 0,85%), adicionado de inibidores de proteases (Coquetel de inibidores, Sigma) e então os parasitos foram lisados por dez ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho-maria a 37°C). A quantidade de proteínas foi dosada usando o BCATM protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Hemoculturas: O sangue de pacientes e controles foi diluído (v/v) em meio RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 2 mM de L-Glutamina (Sigma), 11 mM de bicarbonato de Sódio (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, BR), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), para um volume final de 700 µL, em tubos de fundo cônico de 2 mL (Axygen, Union City, CA, EUA). Os tubos foram incubados, fechados, por 6 h ou 24 h (37°C, sob agitação) na ausência (Meio) ou presença de antígeno de leishmania (IMG3 – 50 µg/mL), agonista de TLR4 (LPS, *E. coli* 0111:B4, Sigma – 100 ng/mL) ou de TLR2 (Pam₃Cys SKKKK, EMC, Tübingen, Alemanha – 100 ng/mL). Stop Golgi (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) adicionados no início de culturas de 6 h, para análise das citocinas intracelulares.

Análises dos monócitos por citometria: O sangue do paciente e seu respectivo controle, antes e após incubação na ausência ou presença de LPS, foi incubado na ausência ou presença de anticorpos monoclonais anti-CD14 (APC, clone M5E2, BioLegend, San Diego, CA, EUA) e anti-CD16 (PE/Cy5, clone 3G8, BioLegend) e seus respectivos isótipos controles, por 15 minutos. Os anticorpos anti-CD16 são do clone 3G8, para facilitar a exclusão de neutrófilos CD16⁺ (Heimbeck et al., 2010). Em seguida, os eritrócitos foram lisados com 2 mL de solução de lise (BioLegend) por 15 minutos. As células foram lavadas com PBS (500 g, 5 min, 4°C), fixadas com solução de paraformaldeído 4% e posteriormente, permeabilizadas com solução de saponina a 0,3%. A marcação intracelular foi realizada utilizando anti-TNF (FITC, clone MAb11,

BioLegend) e anti IL-10 (PE, clone: JES3-19F1, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) por 30 minutos. Após este período as células foram lavadas e ressuspensas em solução de paraformaldeído 1%. A aquisição foi realizada em citômetro FACS CALIBUR (BD). Foram adquiridos 50.000 eventos totais e 10.000 eventos da população CD14⁺. A análise dos dados foi realizada pelo programa FSC versão 4 (DNS, Los Angeles, CA, EUA).

Dosagens de TNF e IL-10 por ensaio imunoenzimático (ELISA):

Microplacas para ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo monoclonal de cobertura anti-TNF (hibridoma B154.7) ou anti-IL10 (JES-9D7). Os hibridomas foram gentilmente cedidos pelo Dr. Giorgio Trinchieri (National Cancer Institute, Maryland, EUA). As placas foram bloqueadas com PBS - 3% de SFB e em seguida, incubadas com os sobrenadantes das hemoculturas. O segundo anticorpo-biotinilado (anti-TNF, hibridoma B154.9 ou anti-IL-10, JES-12G8), seguido do conjugado estreptoavidina-peroxidase (Sigma) foi adicionado, sendo a reação revelada com solução substrato OPD (Sigma) e peróxido de hidrogênio, diluídos em tampão citrato-fosfato. A reação foi finalizada com solução de ácido sulfúrico 2N e a densidade óptica (DO) foi obtida em um leitor de microplacas (Multskam, Thermo Labsystems), utilizando os filtros de 492 nm e referência 620 nm. As concentrações do TNF e IL-10 foram determinadas de acordo com as curvas padrões preparadas com as citocinas recombinantes (R&D System, Mineápolis, MN, EUA), com o limite de detecção de 50 pg/mL e 15 pg/mL, respectivamente.

Análises estatísticas: Os dados são apresentados como valores individuais, medianas e interquartis [25 - 75%], utilizando testes não paramétricos para análises (Mann Whitney para amostras não pareadas e Wilcoxon para amostras pareadas; teste de correlação de Spearman). As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 5.0 Software Inc. (San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

As porcentagens das subpopulações de monócitos CD16+ estão elevadas na LCL

Foram analisados 32 pacientes com LCL, pareados por gênero e idade com controles sadios. Como mostrado na Tabela 1, uma elevada heterogeneidade nos dados dos pacientes foi observada. Os pacientes apresentavam de uma a 14 lesões (mediana: 2), com tempo de evolução variando de 0,5 a 24 meses (mediana: 4 meses). Os pacientes relataram ter contraído a doença nos estados das regiões Norte (n = 9), Nordeste (n = 3) e Centro-Oeste (n = 20). De 32 amostras obtidas por biópsia, 25 foram processadas para avaliação do subgênero de *Leishmania*, sendo 19 caracterizadas como *L. (Viannia) sp.* Vinte pacientes foram tratados, dos quais 15 apresentaram cura clínica após seguimento por três ou seis ou doze meses. Dos cinco que não mostraram cura clínica, um interrompeu o tratamento, dois apresentaram melhora clínica acentuada, mas não retornaram para controle e em dois houve necessidade de novo tratamento. Doze pacientes não retornaram para tratamento após o diagnóstico. As medianas dos números de leucócitos e monócitos no sangue periférico de pacientes e controles não foram estatisticamente diferentes (Tabela 1).

Tabela 1. Dados dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana e controlesa

	Pacientes	Controles
Número	32	32
Gênero ^b	26 M; 6 F	26 M; 6 F
Idade ^c	34 (22 - 47) ^d	31,5 (23,8 - 42,5)
Númerode lesões	2 (1 - 4,8)	-
Tempodas lesões ^e	4 (1,6 - 6,8)	-
Leucócitos/mm ³	8.900(6.300-11.000)	8.700(7.100-11.000)
Monócitos/mm ³	453 (356 - 620)	510 (342 - 624)

^aPacientes com Leishmaniose cutânea localizada; ^bM: masculino; F: feminino; ^cAnos;

^dMediana e interquartis; ^eMeses. ^fLeucócitos e monócitos determinados por contagem em hematocitômetro (análises em 23 pacientes e 22 controles).

Para analisar possíveis alterações das proporções das subpopulações de monócitos no sangue periférico dos pacientes com LCL, inicialmente, os monócitos do sangue recém-colhido foram avaliados de acordo com tamanho (FSC-H) e

granulosidade (SSC-H), como pode ser observado na Figura 1A. Os monócitos estavam marcados por anticorpos anti-CD14 e anti-CD16. O anticorpo anti-CD16 utilizado marca os neutrófilos mais fortemente do que os monócitos, facilitando a eliminação de neutrófilos CD16⁺ da análise dos monócitos (Fig. 1B). As subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺ (Fig. 1C) foram então avaliadas no sangue dos pacientes com LCL, tendo sido demonstrado que a porcentagem dos monócitos expressando CD16 está significativamente aumentada nestes pacientes quando comparada à de indivíduos saudáveis (7,1% [4,5% - 13,9%] vs 4,6% [2,5% - 8,2%], n = 24, p < 0,05, Fig. 1E).

A população de monócitos foi posteriormente avaliada para as três subpopulações de monócitos presentes no sangue, CD14^{hi}CD16⁻, CD14^{hi}CD16⁺ e CD14^{lo}CD16⁺ (os clássicos, intermediários e não clássicos, respectivamente, Fig. 1D). Nos pacientes, a porcentagem da subpopulação de monócitos intermediários CD14^{hi}CD16⁺ mostrou-se significativamente aumentada, quando comparada com aquela de indivíduos saudáveis (3,3% [2,2% - 5,8%] vs 2,2% [1,1% - 3,6%], n = 21, p < 0,05, Fig. 1F). A subpopulação CD14^{lo}CD16⁺ também estava com porcentagem aumentada, porém não foi atestada diferença significativa entre pacientes e controles (4,3% [2,2% - 7,4%] vs 2,5% [1,2% - 3,4%], n = 21, p = 0,10, Fig. 1F).

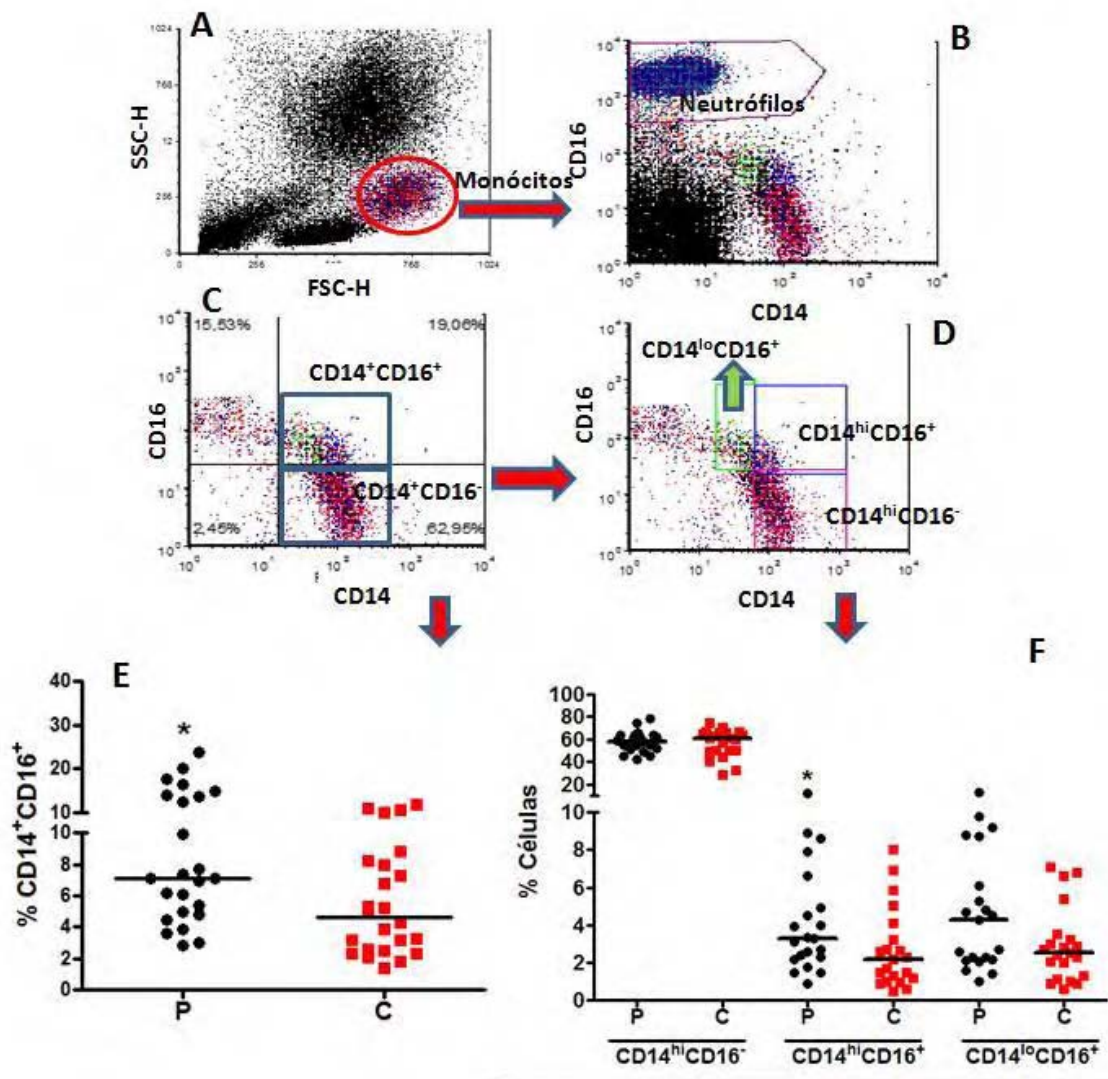


Figura 1. A porcentagem de monócitos $CD14^+CD16^+$ está aumentada em pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada. Sangue periférico recém-colhido de pacientes (P) e controles saudáveis (C) foi tratado com anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 e as subpopulações de monócitos foram avaliadas por citometria de fluxo. Em A, B, C e D são apresentadas as estratégias de análises dos monócitos. Em E (n = 24) e F (n = 21) são apresentados os resultados individuais e as medianas (linhas horizontais). *p < 0,05 (P x C).

Considerando somente os monócitos adquiridos como $CD14^+$ (Fig. 2A), o aumento significativo na subpopulação $CD16^+$ no grupo de pacientes foi confirmado (8,6% [6,2 - 15,8%] vs 5,8% [5,0 - 9,3%]; p < 0,05; n = 24; Fig. 2B, 2D), o qual foi um reflexo do aumento das porcentagens das subpopulações $CD14^{hi}CD16^+$ (4,4% [2,8 - 6,0%] vs 2,9% [2,0 - 4,8%], p = 0,06; n = 24; Fig. 2C, 2E) e $CD14^{lo}CD16^+$ (4,5% [3,2 - 8,4%] vs 3,0% [2,2 - 4,0%], p < 0,05; n = 24; Fig. 2C, 2E).

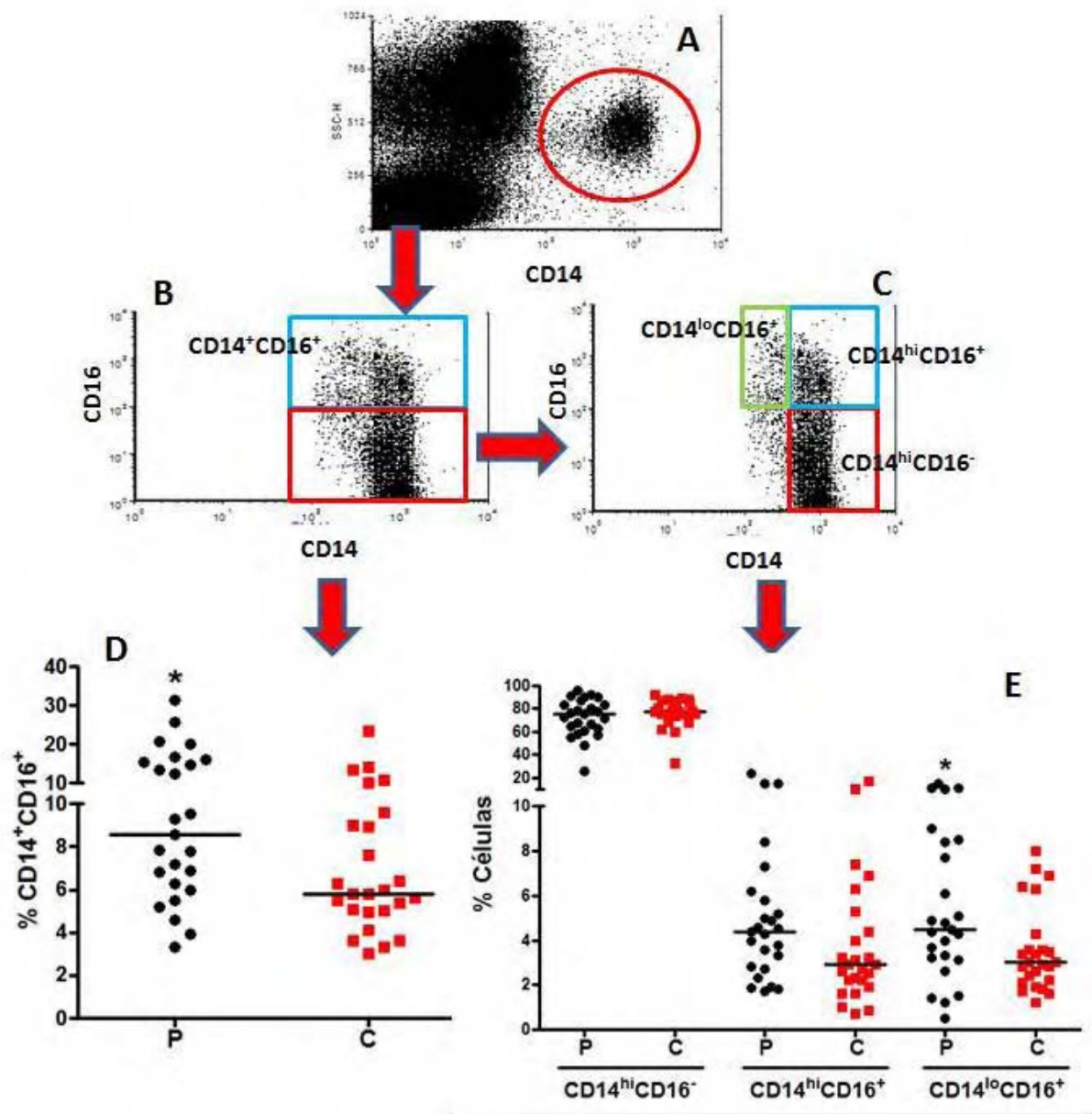


Figura 2. Porcentagens de monócitos intermediários (CD14^{hi}CD16⁺) e não clássicos (CD14^{lo}CD16⁺) aumentam no sangue de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada. Sangue periférico de pacientes (P) e controles saudáveis (C) foi tratado com anticorpos anti-CD14 e anti-CD16. Os monócitos CD14⁺ foram adquiridos (10.000 eventos; A) e avaliados para a expressão de CD16 (B), bem como para as subpopulações de monócitos (C). Em D e E são apresentados os resultados individuais (n = 24) e as medianas (linhas horizontais). *p < 0,05 (P x C; CD14⁺CD16⁺, D; e CD14^{lo}CD16⁺, E); p = 0,06 (P x C, CD14^{hi}CD16⁺, E).

Ativação das hemoculturas com LPS altera as frequências das subpopulações de monócitos e induz produção de TNF e IL-10 tanto nos pacientes com LCL quanto nos controles

A hemocultura tem sido usada para avaliar a produção de citocina por monócitos (Damsgaard et al. 2009). No presente trabalho, as hemoculturas foram ativadas com LPS e as citocinas intracelulares foram avaliadas por citometria de fluxo, para verificar se os monócitos estavam produzindo as citocinas. No entanto, a ativação de monócitos pode modular a expressão das moléculas CD14 e CD16 (Belge et al. 2002, Skinner et al. 2005). Assim, para avaliar se a ativação dos monócitos alteraria as porcentagens das subpopulações de monócitos nas hemoculturas, o sangue periférico de pacientes e controles foi cultivado na ausência ou presença de LPS durante 6 h e as alterações das subpopulações de monócitos foram avaliadas na população CD14⁺. As análises de citometria das hemoculturas de 20 h não foram realizadas, uma vez que as características celulares não foram bem preservadas após este longo período de incubação, dificultando a identificação das células. Portanto, todas as análises de citometria das hemoculturas somente foram realizadas após 6 h de incubação. Como pode ser observado na Figura 3, as subpopulações de monócitos CD16⁺ diminuem após ativação com LPS, tanto nos pacientes com LCL quanto nos controles. A diminuição na porcentagem de células totais CD14⁺CD16⁺ nas culturas dos pacientes e controles (Meio vs LPS: 13,6% [5,9 - 19,5%] vs 6,2% [2,2 - 13,0%], pacientes, Fig. 3A; 9,5% [5,8 - 19,0%] vs 4,8% [3,4 - 12,0%], controles, Fig. 3B; $p < 0,05$) foi um reflexo da diminuição das porcentagens das subpopulações CD14^{hi}CD16⁺ ($p < 0,05$; Fig. 3E e 3F) e CD14^{lo}CD16⁺ ($p < 0,05$; Fig. 3G e 3H). Concomitante à diminuição das subpopulações de monócitos CD16⁺ houve um aumento da porcentagem de células com baixa expressão de CD14 e sem expressão de CD16, tanto nas culturas dos pacientes quanto nas dos controles (Meio vs LPS: 12,0% [7,6 - 24,9%] vs 26,4% [17,6 - 38,8%], pacientes; 11,0% [6,4 - 15,8%] vs 20,6% [10,8 - 33,8%], controles; $p < 0,05$; Fig. 3I e 3J). Não foram atestadas diferenças entre as porcentagens das diferentes subpopulações de pacientes e controles, nas hemoculturas estimuladas ou não com LPS.

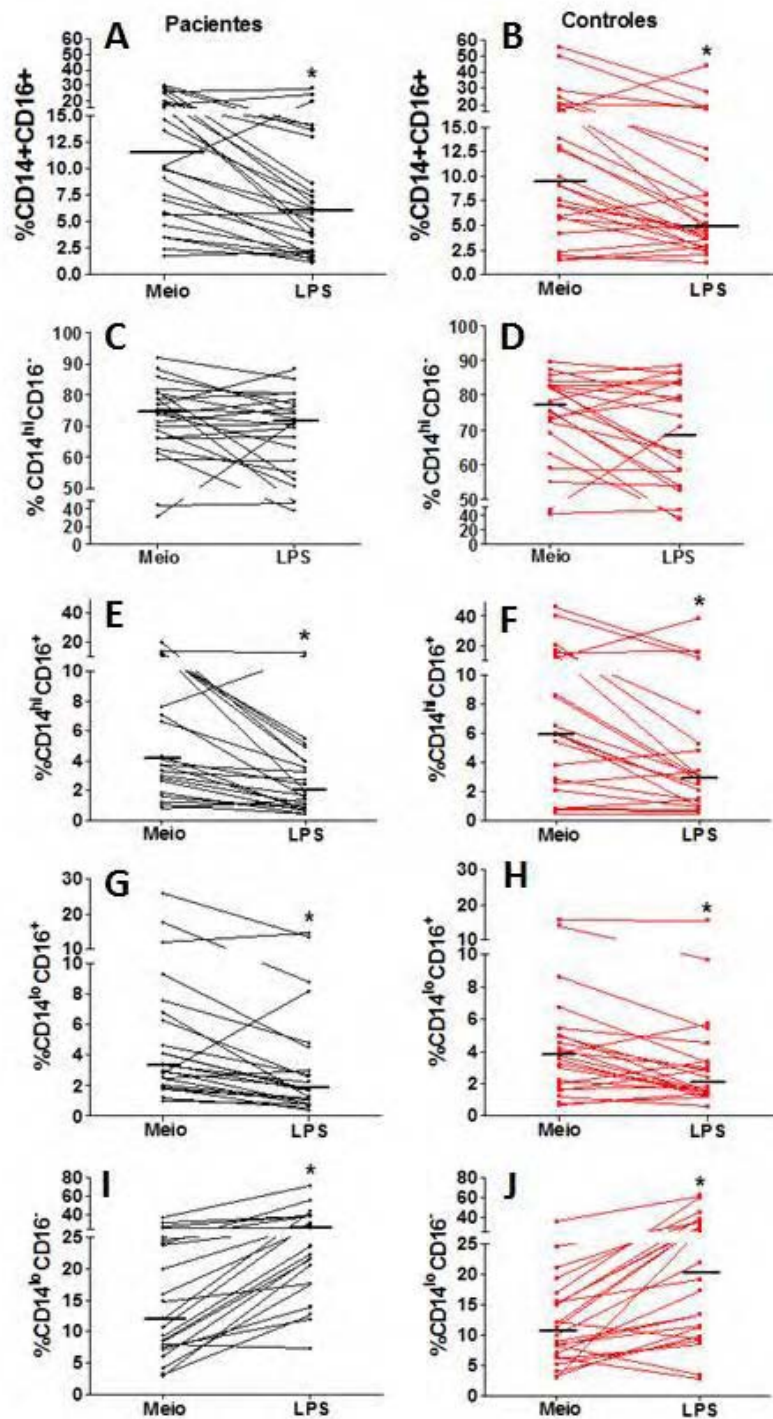


Figura 3. Alterações nas porcentagens das subpopulações de monócitos após ativação com LPS. Sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea e de controles foi cultivado na ausência (Meio) ou na presença de LPS, por 6 h, a 37°C. Após, o sangue foi tratado com anticorpos anti-CD14 e anti-CD16, para análise por citometria de fluxo. São apresentados os valores individuais (n = 22 - 27) e as medianas (linhas horizontais). *p < 0,05. A e B: % monócitos CD14⁺CD16⁺; C e D: % monócitos CD14^{hi}CD16⁻; E e F: % monócitos CD14^{hi}CD16⁺; G e H: % monócitos CD14^{lo}CD16⁺; I e J: % monócitos CD14^{lo}CD16⁻. Preto: Pacientes (A, C, E, G, I); Vermelho: Controles (B, D, F, H, J).

Como a ativação das hemoculturas alterou as porcentagens das subpopulações de monócitos avaliadas pelos marcadores CD14 e CD16, experimentos para checar quais subpopulações de monócitos estavam produzindo as citocinas TNF e IL-10, após ativação não foram possíveis de serem realizados. Assim, para avaliar a produção de citocinas, hemoculturas de pacientes e controles foram incubadas com LPS por 6 h e as citocinas TNF e IL-10 intracelulares foram avaliadas por citometria de fluxo somente nos monócitos CD14⁺. A Figura 4 representa a estratégia de análise das citocinas na janela de monócitos CD14⁺ (Fig. 4A) que haviam sido cultivados na ausência de estímulo (Meio, Fig. 4B, à esquerda) ou presença de LPS (LPS, Fig. 4B, à direita), para avaliação de TNF (eixo Y acima, Fig. 4B) e IL-10 (eixo Y abaixo, Fig. 4B).

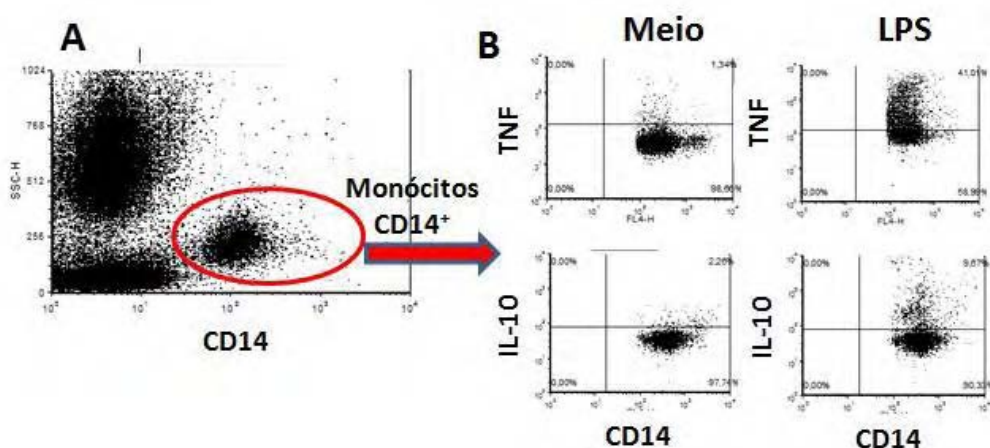


Figura 4. Análise da expressão intracelular de TNF e IL-10 em monócitos CD14⁺ de hemoculturas estimuladas com LPS. Após cultivo por 6 h, na ausência (Meio) ou presença de LPS, células de pacientes e controles foram marcadas com anticorpos anti-CD14, anti-TNF e anti-IL-10, para análises por citometria de fluxo. Em A, seleção da janela dos monócitos CD14⁺. Em B, hemoculturas sem estímulo (Meio, à esquerda) ou com LPS (LPS, à direita); eixo Y acima monócitos expressando TNF; eixo Y abaixo: monócitos expressando IL-10; eixo X: monócitos expressando CD14.

Como pode ser observado na Figura 5, a ativação das hemoculturas, por 6 h com LPS, induziu significante expressão de TNF em monócitos CD14⁺ de pacientes com LCL ou controles (Meio vs LPS: 2,0% [0,8 -3,8%] vs 18,2% [7,2 - 32,6%], pacientes, Fig. 5A; 1,4% [0,7 - 2,1%] vs 10,9% [3,6 - 28,7%], controles, Fig. 5B; $p < 0,05$). Embora poucas células apresentassem IL-10, a expressão de IL-10 também foi

aumentada significativamente pelo LPS em pacientes e controles (Meio vs LPS: 2,1% [0,7 - 3,4%] vs 2,9% [0,8 - 8,1%], pacientes, Fig. 5C; 1,0% [0,5 - 2,5%] vs 2,3% [0,8 - 6,5%], controles, Fig. 5D; $p < 0,05$). Comparando as porcentagens das populações de monócitos CD14⁺TNF⁺ e CD14⁺IL-10⁺ não foram atestadas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e controles. A frequência de células expressando IL-10 foi baixa, como esperado, porque as células foram ativadas por apenas 6 h e a IL-10 é uma citocina produzida tardiamente após ativação. No entanto, pode ser assumido que há uma produção precoce de IL-10 que pode ser detectada já com 6 h de estimulação. A análise das populações duplamente positivas, expressando TNF e IL-10 após ativação com LPS, e daquelas que só expressam TNF ou IL-10 mostrou que a maior porcentagem é a de células TNF⁺, seguida de células duplo-positivas (TNF⁺IL-10⁺) e uma pequena frequência de células unicamente IL-10⁺ (Fig. 5E), sem diferenças significantes entre os grupos de pacientes e controles.

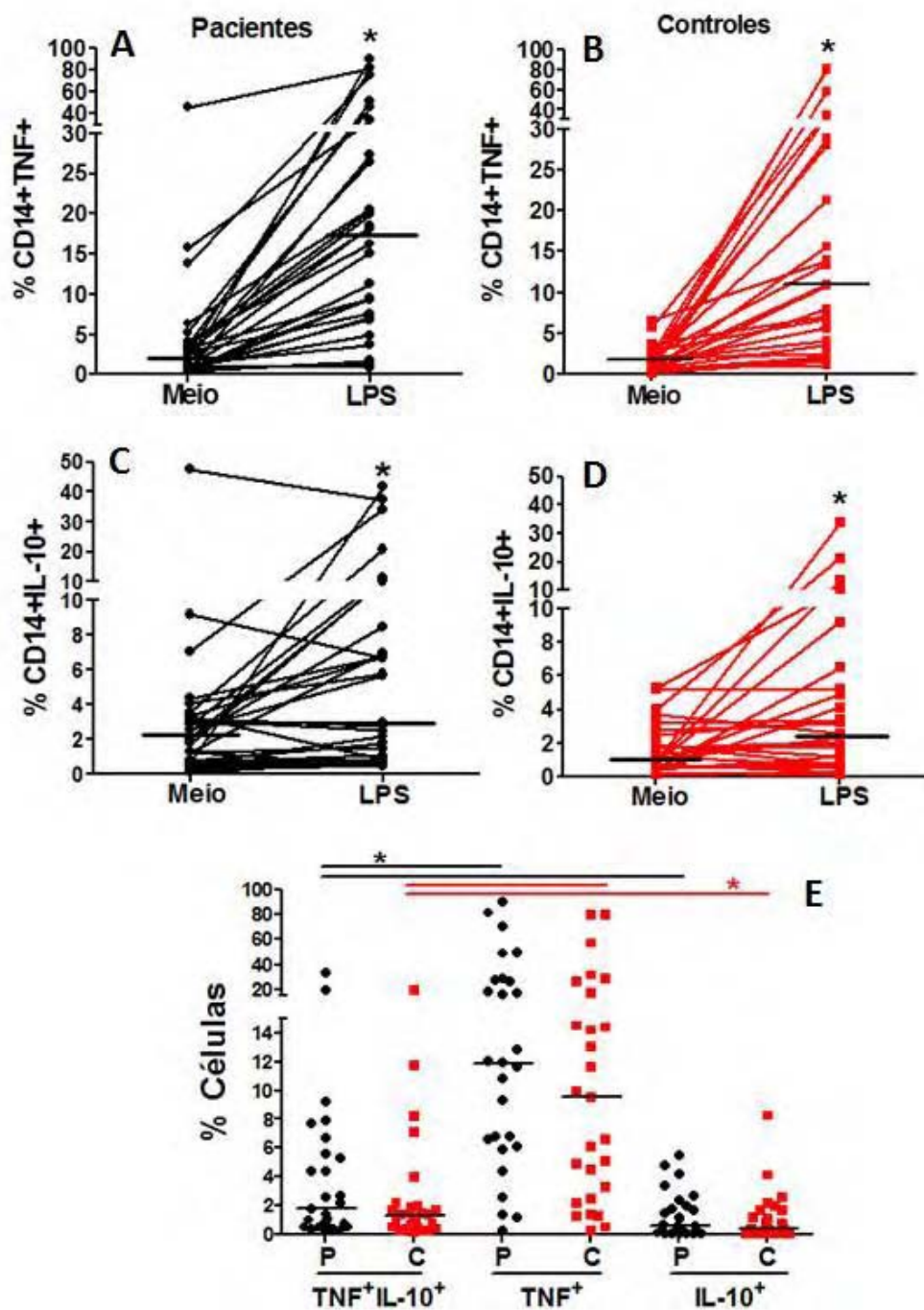


Figura 5. Monócitos CD14⁺ expressam TNF e IL-10 após ativação com LPS: similares resultados em pacientes com leishmaniose cutânea localizada (P) e indivíduos controles (C). Sangue periférico foi cultivado na ausência (Meio) ou presença de LPS, por 6 h. As células foram tratadas com anticorpos anti-CD14, anti-TNF e anti-IL-10 e analisadas para a expressão de TNF (A, B) ou IL-10 (C, D), por citometria de fluxo. Em A, B, C, D e E: são apresentados os valores individuais (n = 27 - 28) e as medianas (linhas horizontais). Em E, as análises para a dupla marcação para TNF e IL-10 nos monócitos CD14⁺. *p < 0,05.

Desequilíbrio na produção de TNF e IL-10 em hemoculturas de pacientes com LCL após ativação com agonistas de TLR e antígenos de *Leishmania (V.) braziliensis*: associação com a gravidade da LCL

Além de possíveis alterações nas porcentagens das subpopulações de monócitos do sangue de pacientes com LCL, a secreção de citocinas pró (TNF) ou antiinflamatórias (IL-10) poderiam estar desequilibradas. O sangue periférico foi cultivado na ausência (Meio) ou presença de agonistas de TLR4 (LPS) ou TLR2 (Pam₃Cys), bem como com antígenos de *L. (V.) braziliensis* (Ag). Após 6 h, o TNF foi mensurado nos sobrenadantes das culturas e a IL-10, após 20 h. Houve liberação de TNF e de IL-10 nas hemoculturas, na ausência de qualquer estímulo, sendo as concentrações de TNF significativamente mais elevadas nas hemoculturas de pacientes do que dos controles ($p < 0,05$, Fig. 6A, 6B, 6C). Após ativação com LPS, Pam₃Cys ou Ag, houve significante aumento na produção de TNF, tanto nas hemoculturas de pacientes com LCL quanto no grupo controle ($p < 0,05$, Fig. 6A, 6B, 6C). As concentrações de TNF, após ativação com LPS ou Ag, foram significativamente maiores nas hemoculturas dos pacientes com LCL do que nas dos controles (Pacientes vs controles -LPS: 1.794,0 [1.315,0 - 3.326,0] pg/mL vs 1.327,0 [977,7 - 2.252,0] pg/mL, $p < 0,05$, Fig. 6A; Ag: 1.378,0 [538,5 - 1.905,0] pg/mL vs 661,5 [333,0 - 1.191,0] pg/mL, $p < 0,05$, Fig. 6C). Com o Pam₃Cys houve uma tendência de mais elevada concentração de TNF nas hemoculturas dos pacientes do que nas dos controles (Pacientes vs controles: 925,0 [425,5 - 2.406,0] pg/mL vs 622,0 [376,0 - 837,0] pg/mL, $p = 0,06$, Fig. 6B).

Nas hemoculturas de pacientes e controles com LCL, os agonistas de TLR4 e TLR2 induziram significante aumento na produção de IL-10 ($p < 0,05$, Fig. 6D, 6E), mas o Ag somente aumentou a produção de IL-10 nas hemoculturas dos controles ($p < 0,05$, Fig. 6F). Não foram atestadas diferenças significantes entre as concentrações de IL-10 quando comparados os grupos de pacientes com LCL e de controles (Fig. 6D, 6E, 6F).

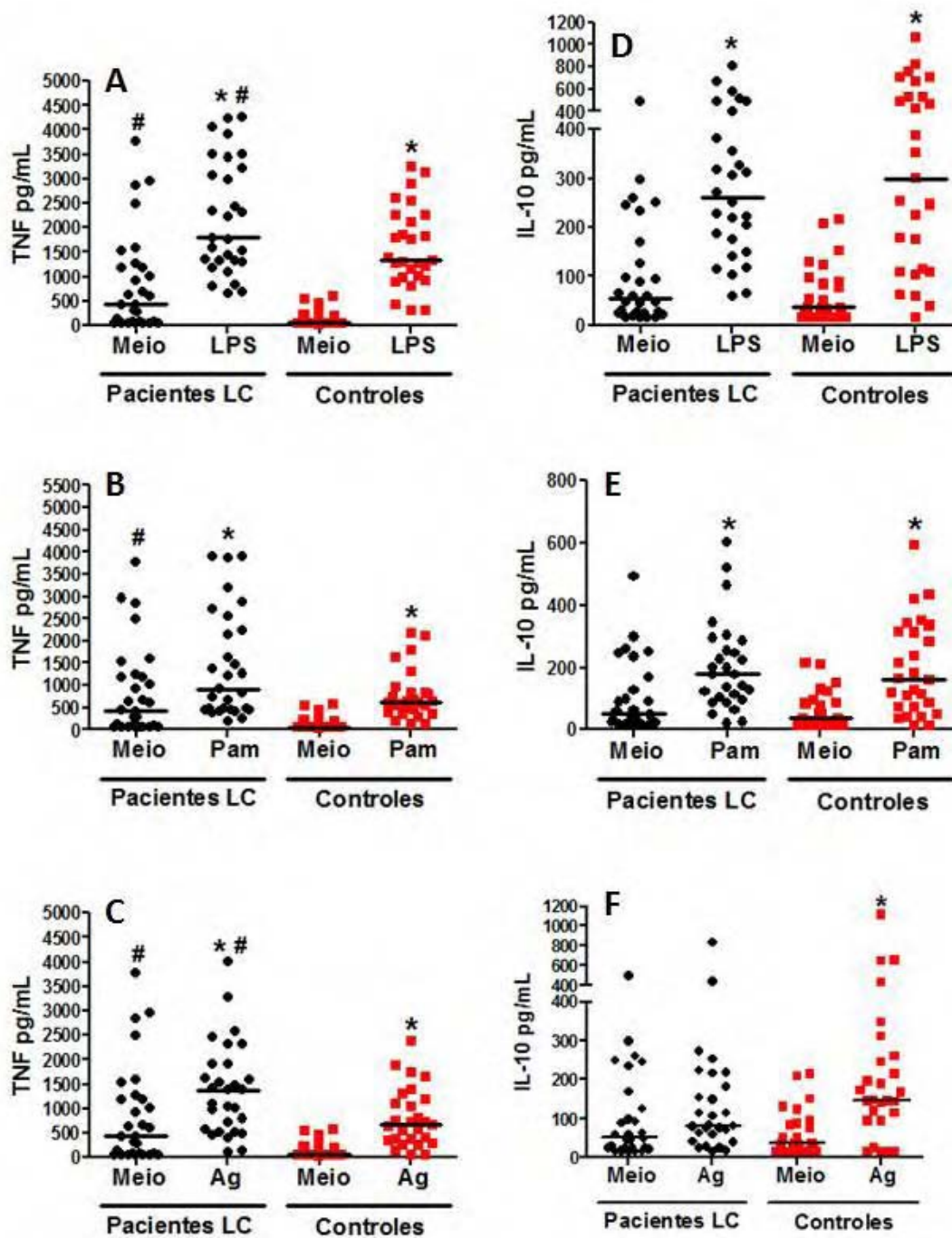


Figura 6. Elevada produção de TNF em hemoculturas de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, antes e após ativação via TLR4 ou TLR2 ou com antígeno de *L. (V.) braziliensis*. Sangue de pacientes e de controles foi cultivado na ausência (Meio) ou presença de agonistas de TLR4 (LPS, A, D) ou TLR2, Pam₃Cys (Pam, B, E), ou de antígeno de *L. (V.) braziliensis* (Ag, C, F). Após 6 h ou 24 h de incubação, respectivamente, as concentrações de TNF e de IL-10 foram mensuradas nos sobrenadantes das culturas, usando ensaio imunoenzimático. São apresentados os valores individuais (n = 26 - 29) e as medianas (linhas horizontais). *p < 0,05 (meio vs estímulo). #p < 0,05 (pacientes vs controles). Preto: Pacientes; Vermelho: Controles.

A mais elevada produção de TNF e similar produção de IL-10 nas hemoculturas dos pacientes, em relação às dos controles, sugeriu um desequilíbrio na produção destas citocinas. Assim, foi avaliado se as concentrações de TNF e IL-10 estavam associadas, após os diferentes estímulos das hemoculturas, mostrando um equilíbrio ou não entre fatores pro- e antiinflamatórios nas hemoculturas. Como pode ser visto na Figura 7, em hemoculturas de pacientes ativadas com LPS ou Ag não foi detectada uma correlação entre concentrações de TNF e IL-10 (Fig. 7A e 7C), mas com o estímulo via TLR2, houve uma moderada correlação positiva ($r = 0,48$, $p < 0,05$, Fig. 7B).

Nas hemoculturas dos controles, houve uma correlação positiva entre as concentrações de TNF e IL-10 após ativação com LPS ($r = 0,43$, $p < 0,05$, Fig. 7D), Pam₃Cys ($r = 0,38$, $p = 0,05$, Fig. 7E) ou com Ag ($r = 0,49$, $p < 0,05$, Fig. 7F).

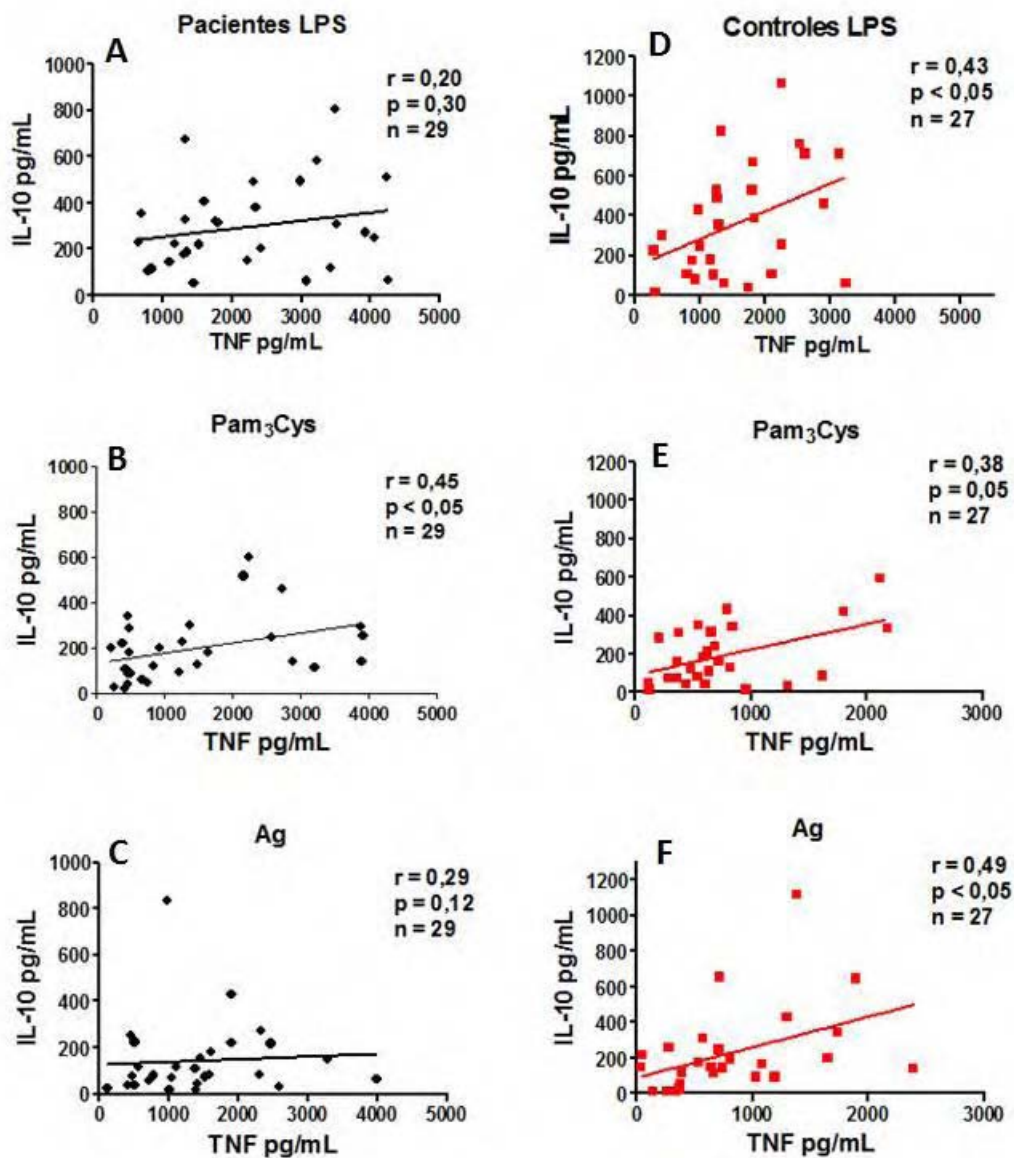


Figura 7: Correlação entre as concentrações de TNF e IL-10 secretados nas hemoculturas de pacientes com leishmaniose cutânea localizada e de indivíduos saudáveis. As hemoculturas foram tratadas com LPS (A, D), Pam₃Cys (B, E) ou antígeno (Ag) de *L. (V.) braziliensis* (C, F), sendo o TNF (6 h) e a IL-10 (24 h) mensurados nos sobrenadantes, usando ELISA. São apresentados os dados individuais dos pacientes (A, B, C) e dos controles (D, E, F). Preto: Pacientes; Vermelho: Controles.

Para avaliar se o desequilíbrio entre citocinas pro- e antiinflamatória, favorecendo um perfil mais inflamatório estava associado à gravidade da LCL, foram realizados testes de correlação entre as concentrações de TNF ou IL-10 nos soros e hemoculturas dos pacientes e o número de lesões cutâneas apresentadas pelos pacientes. Como pode ser observado na Figura 8, quanto maior o número de lesões cutâneas maiores as concentrações de TNF no soro ($r = 0,41$, $p < 0,05$, Fig. 8A) e nas culturas ativadas via TLR4 (LPS; $r = 0,58$; $p < 0,05$, Fig. 8C), TLR2 (Pam₃Cys; $r = 0,45$; $p < 0,05$, Fig. 8D) ou com antígeno de *L. (V.) braziliensis* (Ag; $r = 0,46$; $p < 0,05$, Fig. 8E). Por outro lado, para IL-10 somente foi observada uma tendência a correlação positiva quando as hemoculturas foram ativadas com LPS (Fig. 8H, $p = 0,10$).

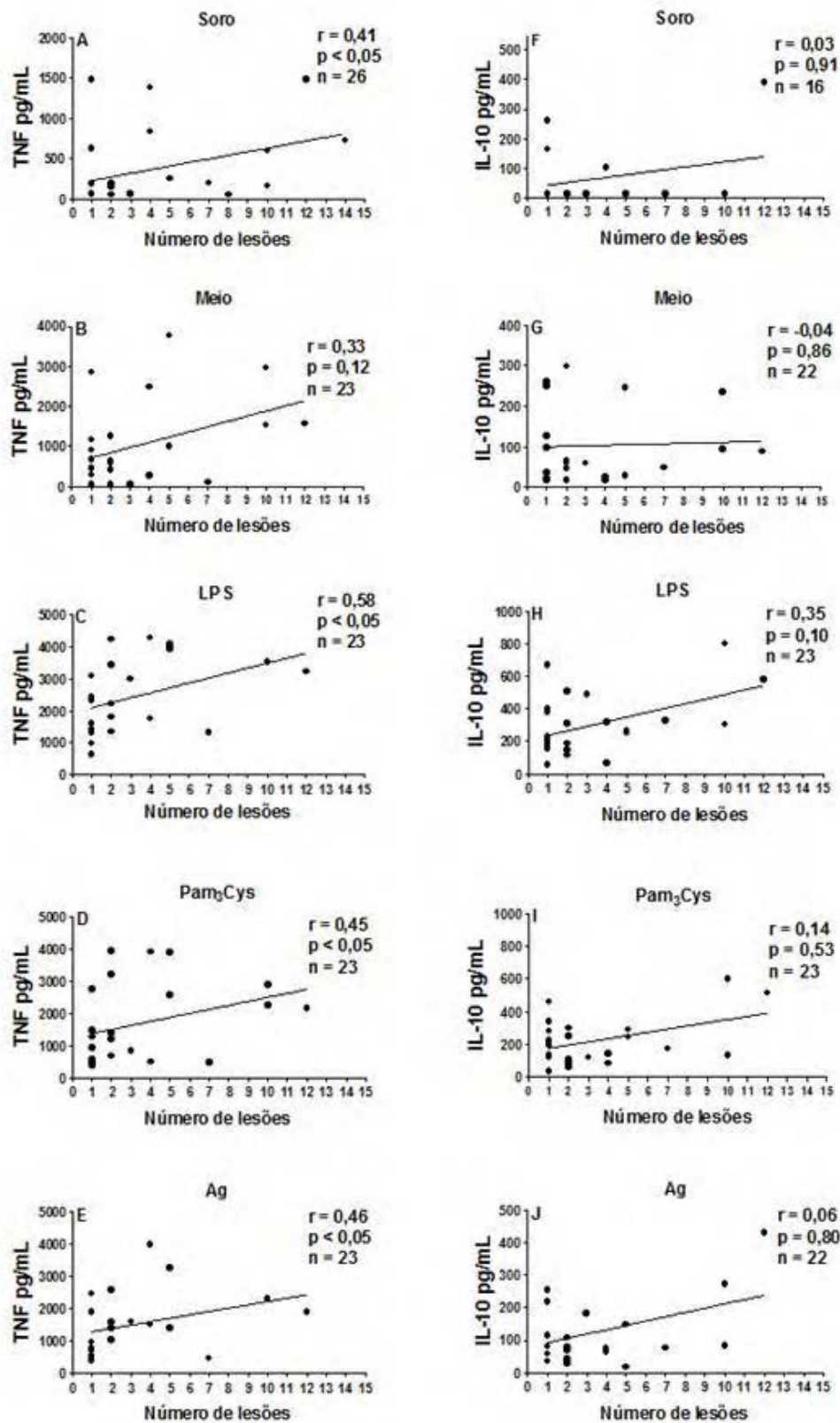


Figura 8. Correlação positiva entre o número de lesões e as concentrações de TNF nos soros e hemoculturas de pacientes com leishmaniose cutânea localizada. As concentrações de TNF (A, B, C, D, E) e de IL-10 (F, G, H, I, J) foram dosadas nos soros (A, F) e nos sobrenadantes das hemoculturas na ausência de estímulo (Meio, B, G) ou presença de LPS (C, H), Pam₃Cys (D, I) ou antígeno (E, J), usando ELISA. Os resultados (pg/mL) foram correlacionados com o número de lesões detectadas nos pacientes ao diagnóstico.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi demonstrado que as subpopulações de monócitos CD16⁺ estão aumentadas no sangue periférico de pacientes com LCL. Tanto a subpopulação de monócitos intermediários (CD14^{hi}CD16⁺) quanto a de monócitos não clássicos (CD14^{lo}CD16⁺) apresentam-se elevadas. Os dados obtidos estão de acordo com aqueles previamente publicados por Soares et al. (2006), embora estes autores tenham avaliado somente a população total CD14⁺CD16⁺, que mostrou-se elevada nos pacientes, e não as três subpopulações de monócitos. O presente trabalho é o primeiro a avaliar as três subpopulações de monócitos do sangue periférico de pacientes com LCL.

O aumento das subpopulações de monócitos não clássicos e intermediários pode causar um desequilíbrio na produção de citocinas pro- e antiinflamatórias no sangue dos pacientes com LCL. Tal desequilíbrio pode resultar no aumento da gravidade da leishmaniose, uma vez que o desenvolvimento das lesões depende da resposta imune do hospedeiro, ou ainda, do controle ou não da infecção. No presente trabalho, em uma tentativa de avaliar a produção de citocinas pelos monócitos em hemoculturas, sangue periférico de pacientes e controles foi incubado com LPS (agonista de TLR4) para a análise das células produtoras de TNF e IL-10, usando citometria de fluxo para análise de citocinas intracelulares. No entanto, foi observado que após incubação com LPS, as porcentagens de células expressando CD14 e CD16 foram alteradas. Houve uma diminuição nas porcentagens de monócitos não clássicos e intermediários, bem como um aumento da frequência de células com baixa expressão de CD14 e ausência de CD16, sugerindo a diminuição da expressão de CD14 e CD16 após cultivo na presença de LPS. Estas alterações estão de acordo com aquelas descritas por Belge et al. (2002) e Skinner et al. (2005) que também avaliaram subpopulações de monócitos em hemoculturas ativadas com LPS. As alterações não permitiram a identificação das subpopulações de monócitos quanto à produção de citocinas ao final do período de incubação das hemoculturas. Portanto, uma análise dos monócitos CD14⁺ totais foi realizada, a qual mostrou que o LPS induziu a expressão de TNF e IL-10 nos monócitos, porém sem diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e controles. Após 6 h de incubação com LPS, a maioria das células expressava somente TNF, seguida por monócitos expressando tanto TNF quanto IL-10 e uma menor proporção de células unicamente IL-10⁺. Tal perfil se deve ao fato do curto período de incubação (6 h), que permite uma melhor detecção de TNF e não de IL-10. A produção

de IL-10 é mais tardia do que a de TNF, mostrando-se elevada após 20 h de cultivo, porém as hemoculturas com 24 h de cultivo apresentaram alterações de granulosidade celular, havendo mistura de polimorfonucleares com monócitos, dificultando as análises por citometria. Apesar do pouco tempo de incubação foi possível detectar que boa parte dos monócitos já expressa TNF e IL-10 simultaneamente. A alta porcentagem de monócitos TNF⁺ e a baixa porcentagem de células IL-10⁺, após ativação com LPS por curto período de tempo, têm sido relatadas previamente (Farina et al. 2004).

No presente estudo, não foram atestadas diferenças significantes entre os resultados de expressão de TNF e IL-10 nos monócitos CD14⁺ de pacientes e controles, mas não se pode eliminar a possibilidade de que uma análise de subpopulações de monócitos mostre diferenças entre estes grupos. Belge et al. (2002) mostraram, em hemoculturas, que os monócitos não clássicos são os principais produtores de TNF, após estimulação com LPS. A presença de células duplo-positivas (TNF⁺ e IL-10⁺), no presente trabalho, demonstra que uma mesma população de monócitos é capaz de produzir ambas as citocinas pro- e antiinflamatória. Este dado está de acordo com aqueles recentemente publicados por Smedman et al. (2011), mostrando que em resposta a agonistas de TLR2 ou TLR4 várias subpopulações de monócitos com distintos perfis de citocinas podem ser identificados.

As alterações encontradas nas porcentagens de monócitos CD16⁺ poderiam ser responsáveis por um desequilíbrio entre citocinas pro- e antiinflamatórias no sangue dos pacientes com LCL. Apesar de não terem sido demonstradas diferenças significantes entre as porcentagens de monócitos TNF⁺ ou IL-10⁺ de pacientes e controles, a secreção destas citocinas ainda poderia estar alterada. Portanto, nós investigamos as concentrações de TNF e IL-10 nas hemoculturas ativadas com agonistas de TLR4 e TLR2 ou antígeno de *L. (V.) braziliensis*, tanto de indivíduos sadios quanto de pacientes com LCL. Em indivíduos sadios, como esperado, houve resposta a todos os estímulos, aumentando tanto a produção de TNF quanto a de IL-10 e houve uma correlação positiva entre as concentrações destas citocinas nas hemoculturas, mostrando o equilíbrio entre citocinas pro- e antiinflamatórias, o que sugere a presença de mecanismos intrínsecos reguladores da resposta inflamatória dos monócitos. Por outro lado, hemoculturas de pacientes com LCL produziram mais TNF e similares concentrações de IL-10 comparadas às hemoculturas de controles, não havendo correlação entre estas citocinas induzidas por LPS ou Ag. Com Pam₃Cys (via TLR2),

todavia, a correlação positiva entre TNF e IL-10 foi mantida nas hemoculturas dos pacientes. Os dados sugerem que, dependendo da via de ativação dos monócitos, um desequilíbrio entre sinais pro- e antiinflamatórios pode ser estabelecido na LCL. Em experimentos com células mononucleares purificadas do sangue periférico de pacientes com LCL ou leishmaniose mucosa (uma forma clínica de LTA mais grave que atinge as mucosas nasal e orofaríngea), estudos prévios têm demonstrado que na LCL há uma correlação positiva entre a frequência de monócitos expressando TNF (TNF⁺ intracelular) e IL-10 (IL-10⁺ intracelular) e que esta correlação é perdida na leishmaniose mucosa, após ativação com antígeno solúvel de leishmania (Antonelli et al. 2004; Gaze et al. 2006). Embora diferenças técnicas possam explicar os resultados aparentemente discrepantes (hemoculturas x células mononucleares, citocinas secretadas x intracelulares, tempo de incubação para dosagens das citocinas e antígeno solúvel x total), a mais provável explicação devem ser as diferenças nas populações dos pacientes com LCL. No presente trabalho, os pacientes com LCL apresentavam variados tempo de evolução das lesões (de 15 dias a 24 meses) e de números de lesões (de uma a 14 lesões). No trabalho de Antonelli et al. (2004), os autores não referem se os pacientes tinham lesões únicas ou múltiplas e o tempo de evolução das lesões variou de 15 dias a apenas três meses. Já no trabalho de Gaze et al. (2006), os pacientes tinham apenas lesões únicas e o tempo de evolução variou de 15 dias a seis meses. O aumentado número de lesões cutâneas é um critério de gravidade da LCL e pode estar associado a um perfil de maior ativação sistêmica dos monócitos, explicando os nossos resultados.

De fato, ao analisarmos a produção de TNF e o número de lesões nos pacientes foi identificada uma correlação positiva entre estes. Não houve correlação entre o número de lesões e as concentrações de IL-10 no soro ou hemoculturas dos pacientes. Uma maior gravidade na LCL, caracterizada por aumentado tamanho das lesões, tem sido associada à produção de TNF (Oliveira et al. 2011), em concordância com os dados aqui obtidos. Na leishmaniose mucosa, uma exacerbada resposta inflamatória tem sido associada à destruição tecidual e gravidade da doença (Bacellar et al. 2002). Os dados do presente trabalho sugerem que também na LCL, um desequilíbrio a favor de citocina pro-inflamatória está associado a uma maior gravidade da doença.

Este é o primeiro estudo dos monócitos em hemoculturas de pacientes com LTA. Como os métodos de purificação dos monócitos podem alterar suas funções, as

hemoculturas são úteis para avaliar as funções destas células em condições de mínimas alterações das funções celulares. Distintos métodos de avaliação de monócitos podem causar sua ativação inespecífica, influenciando os resultados sobre a produção de citocinas por estas células. Embora não haja um consenso quanto a produção preferencial de citocinas por determinadas subpopulações de monócitos, parece que os monócitos não clássicos ($CD14^{lo}CD16^{+}$) são capazes de produzir principalmente citocinas pro-inflamatórias, após ativação com vários agonistas de TLR, e a produção destas citocinas por monócitos intermediários ($CD14^{hi}CD6^{+}$) parece atingir níveis intermediários entre aqueles produzidos por monócitos clássicos e não clássicos (Belge et al., 2002; Skrzeczynska-Moncznik et al. 2008; Won et al., 2011; Won et al. 2012). A produção de citocina antiinflamatória, IL-10, parece ser mais acentuadamente produzida pela população de monócitos clássicos ($CD14^{hi}CD16^{-}$; Cros et al. 2010; Won et al. 2011; Won et al. 2012). No entanto, também foi relatado que os monócitos intermediários são os principais produtores de IL-10 (Skrzeczynska-Moncznik et al. 2008). Estes resultados sugerem que as subpopulações expressando mais CD14 seriam responsáveis pela produção de IL-10 e aquelas expressando mais CD16, pela produção de TNF. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o aumento dos monócitos não clássicos e intermediários pode estar associado ao aumento de TNF induzido por agonista de TLR4, bem como por antígeno de leishmania, gerando um desequilíbrio entre as citocinas TNF e IL-10.

Os resultados obtidos sugerem que os monócitos contribuem para a resposta sistêmica a antígenos de leishmania, podendo causar um desequilíbrio entre sinais pro- e antiinflamatórios com reflexos na progressão da LCL. Macrófagos e células dendríticas são importantes células da imunidade natural que podem determinar o controle ou a exacerbação da doença. Como os monócitos são os precursores de macrófagos e células dendríticas nos tecidos e as subpopulações de monócitos diferem quanto a receptores para quimiocinas (Wong et al., 2011), uma avaliação do perfil destes receptores nos monócitos de pacientes com LCL, simultaneamente à expressão de quimiocinas presentes nas lesões, pode melhorar a compreensão do perfil de migração das subpopulações de monócitos para os sítios das lesões e de sua possível contribuição para a eliminação do parasito ou exacerbação das lesões.

REFERÊNCIAS¹

Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ 2004. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 136: 341-348.

Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27: 669-92.

Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SRNI, Torrentes-Carvalho A, Zagne S-MO, Nogueira RMR, Oliveira-Pinto LM, Kubelka CF 2010. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leukocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology* 130: 202-216.

Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740.

Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L 2002. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168: 3536-42.

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.

Castaño D, García LF, Rojas M. Increased frequency and cell death of CD16⁺ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection 2011. *Tuberculosis (Edinb)* 91: 348-60.

Castellano LR, Correia Filho D, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A, Rodrigues V 2010. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- production. *Human Immunol* 70: 383-390.

¹ de acordo com as normas da Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

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

Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S-Y, Senechal B, Puel A, Bisvas SK, Moshous D, Picard C, Jais J-P, D´Cruz D, Casanova J-L, Trouillet C, Geissmann F 2010. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375-386.

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

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

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

Heimbeck I, Hofer TPJ, Eder C, Kwright A, Frankenberger M, Boghdadi G, Scherberich J, Ziegler-Heitbrock L 2010. Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes in females. *Cytometry Part A. International Society for Advancement of Cytometry* 77A:823-830.

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

Han J, Wang B, Han N, Zhao Y, Song C, Feng X, Mao Y, Zhang F, Zhao H, Zeng H 2009. CD14^{high}CD16⁺ rather than CD14^{low}CD16⁺ monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52: 553-559.

Ogonda LA, Orago ASS, Otieno MF, Adhiambo C, Otieno W, Stoute JA 2010. The levels of CD16/Fc receptor IIIA on CD14⁺CD16⁺ monocytes are higher in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia than in children with cerebral or uncomplicated malaria. *Infect. Immunity* 78: 2173-2181.

Oliveira F, Bafica A, Rosato AB, Favali CBF, Costa JM, Cafe V, Barral-Netto M, Barral A 2011. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 85: 70-73.

Passos VM, Lasmar EB, Gontijo CM, Fernandes O, Degraive W 1996. 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* 91: 19-20.

Pereira LIA, Dorta ML, Pereira AJCS, Bastos RP, Oliveira MAP, Pinto SA, Galdino Jr H, Mayrink W, Barcelos W, Toledo VPCP, Lima GMCA, Ribeiro-Dias F 2009. Case report: increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens. *Am J Trop Med Hyg* 81: 378-383.

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

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

Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421-52.

Silveira FT, Lainson R, Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CEP 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 423-431.

Skinner NA, MacIsaac CM, Hamilton JA, Visvanathan K 2005. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14^{dim}CD16⁺ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin Exp Immunol* 141: 270-278.

Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J 2008. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 67: 152-159.

Smedman C, Ernemar T, Gudmundsdotter L, Gille-Johnson P, Somell A, Nihlmark K, Gårdlund B, Andersson J, Paulie S. FluoroSpot analysis of TLR-activated monocytes

reveals several distinct cytokine secreting subpopulations 2011. *Scand J Immunol* 75: 249-258.

Soares G, Barral A, Costa JM, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J 2006. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased *ex vivo* levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol* 79: 36-39.

van de Veerdonk FL, Netea MG 2010. Diversity: a hallmark of monocyte society. *Immunity* 33: 289-291.

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.

Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, Wong SC 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118: e16-31.

Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC 2012. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 53: 41-57.

Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, Heine GH 2011. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50-61.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*.116: e74-80.

DISCUSSÃO FINAL

No primeiro artigo deste trabalho (Pereira et al. 2009) foi relatado um caso clínico de um paciente com LCD que recebeu quimioterapia durante 14 anos, fazendo uso de medicamentos de primeira e segunda escolha para tratamento de leishmaniose, entre eles o antimonial pentavalente, a anfotericina B e a pentamidina. Durante estes anos de terapia, as recaídas foram frequentes, o que é um aspecto da LCD relatado por vários autores na literatura (Convit et al. 1972, Bonfim et al. 1996, Calvopina et al. 2006, Zerpa et al. 2007). Não existe ainda uma terapia totalmente eficaz para LCD. No presente trabalho, o paciente apresentava, na primeira consulta em 2003, lesões disseminadas pelo corpo, sendo estas nodulares, ulceradas, vegetativas e infiltrantes, características de LCD (Convit et al. 1993, Gontijo & Carvalho 2003, Silveira et al. 2004). Os exames histopatológicos, realizados ao diagnóstico e em algumas recaídas, mostraram típicos granulomas com macrófagos repletos de formas arredondadas identificadas como formas amastigotas de *Leishmania* sp pela reação de imunoistoquímica. Os aspectos histopatológicos estavam de acordo com aqueles descritos anteriormente para LCD (Convit et al. 1993, Silveira et al. 2004). Os parasitos foram isolados das lesões em 2003 e 2006 (isolados denominados MAB3 e MAB6) e o sequenciamento do DNA do parasito revelou a espécie *L. (L.) amazonensis*. Esta é considerada a única espécie que causa LCD no Brasil (Silveira et al. 2004, MS Brasil 2007).

Ao diagnóstico, o paciente apresentou teste intradérmico de Montenegro negativo, mas foram detectados anticorpos IgG contra os parasitos. A ausência de resposta imune celular e presença de resposta imune humoral é característica da LCD, acreditando-se que haja uma deficiência na resposta de linfócitos T específica para antígenos de leishmania nos pacientes (Convit et al. 1972, Convit et al. 1993, Silveira et al. 2004). Por outro lado, a espécie *L. (L.) amazonensis* inibe ou altera várias funções de macrófagos e linfócitos T, dificultando uma eficaz resposta imune que leve à eliminação do parasito (Balestieri et al. 2002, Ji et al. 2003, Pinheiro et al. 2004). Em uma tentativa de melhorar a resposta imune celular específica do paciente aqui relatado e curar as lesões, foi realizada uma imunoquimioterapia, usando vacinas monovalentes de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) amazonensis* junto com o adjuvante BCG e a quimioterapia, baseada em trabalhos previamente publicados (Convit et al. 1987, Toledo et al. 2001,

Convit et al. 2004). Os nossos resultados mostraram que com a imunoterapia houve uma diminuição do uso de fármacos e um aumento do tempo entre as recaídas, que foram com lesões menos graves, bem como cura clínica de todas as lesões ao final de 32 meses de tratamento. Houve diminuição nos custos e no sofrimento do paciente durante o tratamento. Apesar de apresentar uma reação positiva ao PPD (proteína purificada derivada de micobactéria) no teste cutâneo, o paciente não respondeu a antígenos de *L. (L.) amazonensis* nos testes intradérmicos. Assim como também não foi detectada resposta *in vitro* dos linfócitos a antígenos de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*. As respostas destas células a outros estímulos estavam preservadas. Os dados mostram que apesar da cura clínica das lesões, não houve indução de resposta imune celular específica aos antígenos de *Leishmania*. Durante a imunoterapia com vacinas de leishmania mais BCG tem sido demonstrada melhora ou cura clínica e encontrada uma resposta imune celular aos antígenos de leishmania, especialmente nos pacientes com LCL e LCM (Convit et al. 1987, Cabrera et al. 2000, Toledo et al. 2001). Em pacientes com LCD, Convit et al. (2004) mostraram que três pacientes tratados com vacina de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* mais BCG evoluíram para cura clínica (acompanhamento por 10 meses), com teste de Montenegro positivo, ou seja, parece ter sido induzida uma resposta imune celular nos pacientes. Os pacientes eram crianças com LCD há menos de cinco anos, portanto, considerada inicial. No caso do paciente do presente trabalho, a doença tinha uma evolução de 15 anos antes de iniciar a imunoterapia. A LCD geralmente acomete crianças, mas só é diagnosticada anos mais tarde, podendo ser sugerido que a imaturidade do sistema imune contribua para o estabelecimento de uma tolerância aos antígenos de leishmania. Assim, um diagnóstico rápido na infância com o estabelecimento de imunoterapia seja o ideal para conseguir induzir uma resposta imune celular eficaz nos pacientes com LCD.

Sabendo que o BCG é um forte adjuvante que ativa várias células da imunidade natural, entre elas as células NK e os monócitos/macrófagos (Atkinson et al. 2000, Esin et al. 2004, Suttman et al. 2004, Batoni et al. 2005), antes e durante a imunoterapia do paciente descrito no presente trabalho, foram avaliadas as alterações nas frequências de subpopulações de células NK e de monócitos do sangue periférico. Com a imunoterapia foi demonstrado um aumento da subpopulação de monócitos $CD14^+CD16^+$ (atualmente referidos como monócitos não clássicos $CD14^{lo}CD16^+$) e das células NK $CD16^+CD56^+$, especialmente da subpopulação NK

CD16⁺CD56^{dim}. As células CD56⁺ foram detectadas em elevado número nas lesões em processo de cura, sugerindo que a infiltração de células NK nas lesões auxilia a cura clínica. A ativação de monócitos e células NK pelo BCG aumenta a produção de citocinas que são importantes para a ativação dos macrófagos, tais como TNF e IFN, e controle da infecção por *Leishmania* sp (Liew et al. 1990, Suttman et al. 2004, Batoni et al. 2005, Mukbel et al. 2007).

O BCG aumenta a capacidade citotóxica de células NK, aumentando a expressão de moléculas citotóxicas, tais como a perforina e as granzimas, especialmente na subpopulação NK CD16⁺CD56^{dim} (Brandau et al. 2000, Batoni et al. 2005). Uma interação entre células NK e monócitos em sítios inflamatórios tem sido descrita (Dalbeth et al. 2004), promovendo uma alça de retroalimentação na produção de citocinas de ambas as células. A importância das células NK no controle da leishmaniose tem sido descrita, tanto produzindo citocinas moduladoras das funções dos macrófagos e linfócitos T, quanto exercendo citotoxicidade contra os macrófagos infectados ou diretamente contra os parasitos (Scharton & Scott 1993, Barral-Neto et al. 1995, Maasho et al. 1998, Aranha et al. 2005). Portanto, sugere-se que no presente caso descrito, a imunoterapia com vacina de leishmania mais BCG, na presença de quimioterapia, levou à cura de todas as lesões do paciente devido à morte dos parasitos pelos fármacos, à ativação dos macrófagos infectados diretamente pelo BCG ou indiretamente via monócitos não clássicos e células NK, e à citotoxicidade exercida por células NK contra macrófagos infectados e parasitos. A imunoestimulação auxiliou na cura mais rápida das lesões e necessidade de menor quantidade de fármacos, diminuindo os custos e o sofrimento do paciente. Portanto, sugerimos que em situação de ausência de resposta imune adquirida, como na LCD, a ativação da imunidade natural pode ser essencial para a cura mais rápida, embora transitória da leishmaniose, diminuindo os efeitos colaterais dos fármacos usados no tratamento, bem como os problemas psicossociais em decorrência da desfiguração causada pelas lesões, portanto melhorando a qualidade de vida do paciente.

A avaliação de subpopulações de monócitos e de células NK em paciente tratado com imunoquimioterapia usando vacina de leishmania mais BCG, em paciente com LCD, foi descrita pela primeira vez neste trabalho. Apenas um trabalho sobre avaliação de monócitos em pacientes com LTA foi publicado até o momento (Soares et al. 2006), mostrando que em pacientes com LCL há um aumento dos monócitos CD16⁺, sem

avaliar as três subpopulações dos monócitos. Soares et al. (2006) sugeriram que os monócitos CD16⁺ podem estar envolvidos na gravidade da LCL, pois pacientes com dificuldade de cura clínica das lesões apresentavam frequências elevadas dos monócitos CD16⁺ na primeira consulta. À época, os monócitos CD14^{lo}CD16⁺ (também referidos apenas como CD14⁺CD16⁺) eram considerados pro-inflamatórios por serem bons produtores de TNF e apresentarem baixa produção de IL-10, após ativação via alguns TLRs (Ziegler-Heitbrock 1996, Belge et al. 2002), sendo o TNF associado à gravidade da LM (Blackwell 1999). No caso do paciente com LCD relatado no presente trabalho, no entanto, monócitos ativados, produtores de TNF, podem ser benéficos para a cura da lesão, uma vez que a infecção por *L. (L.) amazonensis* nesta forma clínica da doença induz anergia (Silveira et al. 2009). Estes dados, somados à falta de uma avaliação das proporções das três diferentes subpopulações de monócitos no sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA, nos levaram a realizar o trabalho apresentado no segundo capítulo desta tese.

No artigo 2, foi demonstrado que as subpopulações de monócitos intermediários (CD14^{hi}CD16⁺) e dos não clássicos (CD14^{lo}CD16⁺) estão aumentadas na LCL. Estes dados corroboraram aqueles de Soares et al. (2006), indicando um aumento das subpopulações de monócitos que expressam CD16 em pacientes com LCL e acrescentam a informação de que ambas as subpopulações de monócitos CD16⁺ estão aumentadas nos pacientes com esta forma clínica da LTA.

Uma alteração das proporções das subpopulações de monócitos pode gerar um desequilíbrio na produção de citocinas pro- e antiinflamatórias, uma vez que tem sido demonstrado que as diferentes subpopulações respondem diferentemente aos diversos agonistas de TLRs (Cros et al. 2010, Won et al. 2011). De fato, no presente estudo, foi observado que as hemoculturas de pacientes com LCL produziram mais TNF e similares concentrações de IL-10 em comparação às das hemoculturas de indivíduos saudáveis. A avaliação da produção de citocinas TNF e IL-10 na LTA tem sido realizada em culturas de células mononucleares isoladas do sangue periférico, especialmente avaliando a imunidade adquirida (Gomes-Silva et al. 2007, Reis et al. 2009, Castellano et al. 2009), havendo poucos trabalhos avaliando estas citocinas produzidas pelos monócitos, presentes nas células mononucleares isoladas (Antonelli et al. 2004, Gaze et al. 2006). Sobre a imunidade adquirida, há relatos de concentrações similares de TNF nas culturas de células mononucleares de pacientes com LCL ou LM ativadas com

antígenos de *Leishmania* sp (Ribeiro-de-Jesus et al. 1998), bem como aumento de TNF e diminuída produção de IL-10 na LM em relação a LCL (Bacellar et al. 2002). Neste último trabalho foi demonstrado que a principal fonte de TNF eram os linfócitos T CD4⁺ e não os monócitos.

Mais importante do que avaliar os valores absolutos das citocinas pro- e antiinflamatórias, detectadas nas hemoculturas, é avaliar o equilíbrio das citocinas produzidas após a ativação dos monócitos. É esperado que após ativação, as células produzam fatores pro- e antiinflamatórios para um adequado controle do processo inflamatório. No presente trabalho, isto foi o que ocorreu nas hemoculturas dos indivíduos saudáveis, tanto com ativação via TLR4 ou via TLR2, quanto após cultivo com os antígenos de *L. (V.) braziliensis*, que utiliza diferentes receptores. Nas hemoculturas dos pacientes com LCL houve uma perda deste equilíbrio na produção das citocinas TNF e IL-10, após ativação via TLR4 e com antígenos de leishmania. Quando a ativação foi via TLR2, no entanto, houve uma manutenção do equilíbrio da produção das citocinas pro- e antiinflamatórias nas hemoculturas dos pacientes. Antonelli et al. (2004) e Gaze et al. (2006) mostraram que a produção de TNF e IL-10, por monócitos de pacientes com LCL, apresenta correlação positiva, mas que falta esta correlação nos pacientes com LM, quando células mononucleares são ativadas com antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. Estes dados são contraditórios aos obtidos no presente trabalho, o que talvez seja explicado pelas diferenças metodológicas, aqui foram analisadas as citocinas secretadas enquanto nos trabalhos citados, foram analisadas citocinas intracelulares, usando citometria de fluxo.

No presente trabalho, o desequilíbrio na produção de citocinas pro- e antiinflamatória parece depender da via de ativação dos monócitos. Os dados sugerem que a via de ativação de TLR4 e de outros receptores para os antígenos de leishmania, mas não a via TLR2, pode favorecer o desequilíbrio entre citocinas pro- e antiinflamatórias produzidas pelos monócitos dos pacientes infectados por *Leishmania* sp. Outra possibilidade seria a diferencial expressão de receptores para padrões moleculares de *Leishmania* sp nas subpopulações de monócitos dos pacientes com LCL. Belge et al. (2002) mostraram, em hemoculturas, que os monócitos CD14^{lo}CD16⁺ eram a principal fonte de TNF em resposta a LPS e a Pam₃Cys, respondendo mais ao Pam₃Cys por serem a subpopulação de monócitos com maior expressão de TLR2. Já Skrzeczynska-Moncznik et al. (2008), após separação das subpopulações dos

monócitos, também mostraram que os monócitos CD14^{lo}CD16⁺ são os que produzem mais TNF em resposta a LPS, no entanto, os CD14^{hi}CD16⁺ também produzem TNF em resposta à ativação via TLR4. Estes autores mostraram ainda que, em resposta a agonistas de TLR2, ambas as subpopulações CD16⁺ produzem similares quantidades de TNF, sendo os monócitos clássicos fracos produtores de TNF em resposta tanto a agonistas de TLR4 quanto de TLR2. Monócitos expressam TLR2 e TLR4, entre outros receptores, que podem ter sua expressão modulada por seus agonistas (Skinner et al. 2005, Juarez et al. 2010). Uma avaliação de TLRs nas diferentes subpopulações dos monócitos do sangue dos pacientes com LTA deve ser realizada para melhor entender o desequilíbrio da produção das citocinas pro- e antiinflamatória presente em pacientes com LCL.

No presente trabalho, em uma tentativa de estabelecer correlações entre as porcentagens de subpopulações de monócitos com a produção das citocinas, as concentrações de TNF e IL-10 secretadas nas hemoculturas foram analisadas em relação às frequências das subpopulações de monócitos detectadas no sangue antes de realizar as hemoculturas. Não foi possível estabelecer essas correlações, o que pode ser devido à elevada variabilidade na produção de citocinas detectadas nos diferentes ensaios de hemoculturas. Ao pesquisar citocinas intracelulares, foi demonstrado que os monócitos são a fonte de TNF e IL-10 nas hemoculturas ativadas, porém, não foram atestadas diferenças significantes entre as frequências de monócitos CD14⁺TNF⁺, CD14⁺IL-10⁺ ou CD14⁺TNF⁺IL-10⁺ de pacientes e controles. E não foi possível estabelecer quais subpopulações de monócitos estariam expressando estas citocinas ao final do período de incubação das hemoculturas, pois após ativação celular houve alteração das porcentagens das subpopulações avaliadas pela expressão de CD14 e de CD16. A diminuição de CD14 e de CD16, após ativação de monócitos em hemoculturas, tem sido relatada, em concordância com os nossos resultados (Belge et al. 2002, Skinner et al. 2005).

Foi detectada uma correlação positiva entre o número de lesões dos pacientes com LCL e as concentrações de TNF produzidas antes e após ativação das hemoculturas, no presente estudo, sugerindo uma associação entre produção de TNF e gravidade da LCL. Tal associação foi previamente descrita por Oliveira et al. (2011), considerando o tamanho das lesões dos pacientes e a produção de TNF observada em culturas de células mononucleares ativadas com antígeno solúvel de leishmania. Uma

associação entre níveis de TNF e gravidade da LTA vem sendo descrita na LM, onde a destruição tecidual é mediada por uma forte resposta imune adquirida mediada por TNF produzido principalmente por linfócitos Th1 (Bacellar et al. 2002). Coletivamente, os nossos dados mostram que as subpopulações dos monócitos estão alteradas na LCL, que o equilíbrio entre a produção de citocina pro- e antiinflamatória é perdido, havendo uma elevada produção de TNF que é associada à gravidade da LCL, e que esta perda de equilíbrio pode ser devido ao aumento das subpopulações de monócitos não clássicos e intermediários ativados por diferentes receptores.

Alguns trabalhos em que foram avaliadas as subpopulações de monócitos durante infecções por bactéria, vírus e o protozoário plasmódio (Han et al. 2009, Azeredo et al. 2010, Ogonda et al. 2010, Castaño et al. 2011), mostraram o aumento das duas subpopulações de monócitos CD16⁺ ou o aumento preferencial dos monócitos intermediários. Este aumento pode estar associado à gravidade das doenças, como é o caso de pacientes infectados com HIV (Han et al. 2009), com sepse ou malária (Skinner et al. 2005, Ogonda et al. 2010, Wong et al. 2012). Os mecanismos propostos para a participação de monócitos CD16⁺ na gravidade das infecções podem envolver maior suscetibilidade de determinadas subpopulações à infecção, o que pode causar a disseminação de microrganismos, eliminação da célula hospedeira ou alteração das funções celulares; ativação por imunocomplexos que se ligam ao CD16 e produção desequilibrada de citocinas pro-inflamatórias ou antiinflamatórias (Soares et al. 2006, Han et al. 2009, Ogonda et al. 2010, Castaño et al. 2011).

No presente trabalho, a avaliação das citocinas foi realizada em hemoculturas de pacientes com LTA pela primeira vez. A vantagem da hemocultura é a avaliação dos monócitos em condições mais fisiológicas, evitando ativação celular que pode ocorrer durante a realização de técnicas de isolamento dos monócitos (Damsgaard et al. 2009). No sangue periférico, além dos monócitos, os granulócitos, linfócitos e células NK também são fontes de citocinas. No entanto, Damsgaard et al. (2009) mostraram que IL-6, TNF e IL-10 são principalmente produzidos por monócitos em hemoculturas e que estas são mais adequadas para avaliar a produção de citocinas de monócitos do que preparações de células mononucleares. A produção de TNF (6 h) e IL-10 (24 h) em hemoculturas, bem como de quimiocinas, é principalmente devido à presença dos monócitos, com pouca contribuição dos granulócitos (Moller et al. 2005, Damsgaard et al. 2009). Os granulócitos neutrófilos produzem pequenas quantidades de TNF e

pequenas contaminações com monócitos muitas vezes explica a detecção de citocinas/quimiocinas em preparações de neutrófilos (Wang et al. 1994). Os neutrófilos não expressam CD14 ou expressam em baixas quantidades, mas expressam TLR2 e TLR4 e respondem aos agonistas destes receptores (Mirlashari & Lyberg 2003, Gomes et al. 2010), por isto não é possível excluir completamente a participação dos neutrófilos na produção de TNF e IL-10 nas hemoculturas de pacientes e controles. No entanto, as análises de expressão de TNF e IL-10 nos neutrófilos CD16^{hi}, no presente estudo, mostraram que, em algumas hemoculturas de pacientes houve expressão de TNF após ativação com LPS, mas nenhuma expressão significativa de IL-10 foi detectada nas hemoculturas ativadas com LPS (dados não mostrados). A rápida produção de TNF nas hemoculturas (6 h) praticamente exclui a possibilidade de linfócitos T estarem contribuindo para a produção desta citocina, mas não se pode excluir alguma contribuição destas células para a produção de IL-10, após ativação das hemoculturas.

Neste trabalho, foi avaliada a participação dos monócitos na LTA, em paciente no pólo anérgico da doença (LCD) e em pacientes com LCL apresentando de uma a 14 lesões cutâneas. Foi demonstrado que os monócitos CD16⁺ uma vez ativados na LCD pode auxiliar na cura clínica das lesões, pois, o aumento destas células após imunoquimioterapia foi associado a uma regressão das lesões. Na LCL, foram avaliadas as três subpopulações dos monócitos, mostrando que há um aumento das subpopulações de monócitos CD16⁺. Houve também um aumento na produção de TNF associado á gravidade da LCL. É sugerido que as subpopulações de monócitos podem ter papéis distintos na interação parasito-hospedeiro, da qual se estabelece a resposta imune e a forma clínica da LTA. Uma compreensão de como estas subpopulações estão atuando nas diferentes formas clínicas pode contribuir para o melhor conhecimento da imunopatogenia da LTA, podendo levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

CONCLUSÕES

Geral: Alterações nas subpopulações dos monócitos podem contribuir para o controle ou para a exacerbação das lesões da LTA, dependendo da forma clínica da doença.

Específicas:

Do artigo 1:

- A ativação de monócitos CD14⁺CD16⁺ (não clássicos) e de células NK contribui para o controle da infecção causada por *L. (L.) amazonensis* em paciente com LCD tratado com BCG/vacinas de leishmanias/quimioterapia.

Do artigo 2:

- As subpopulações de monócitos CD16⁺ (não clássicos e intermediários) estão aumentadas no sangue periférico de pacientes com LCL;

- Foi detectada uma similar expressão das citocinas TNF e IL-10 intracelularmente nos monócitos CD14⁺, após cultura com LPS (via TLR4), de pacientes com LTA e indivíduos controles. Não foi possível avaliar quais subpopulações de monócitos estavam produzindo as citocinas, porque após ativação dos monócitos com LPS houve alteração das porcentagens das subpopulações dos monócitos.

- Após ativação de hemoculturas com agonistas de TLR2 e TLR4 ou antígenos de *L. (V.) braziliensis*, hemoculturas de pacientes com LCL produzem mais TNF e similares concentrações de IL-10 em relação a controles sadios, havendo uma perda da correlação positiva entre as concentrações de TNF e IL-10, após ativação com LPS ou antígeno de leishmania.

- Houve uma correlação positiva entre as concentrações de TNF presentes no soro e produzidos antes e após diferentes estímulos nas hemoculturas e o número de lesões dos pacientes com LCL. Nenhuma correlação com as concentrações de IL-10 foi observada.

REFERÊNCIAS²

Abeles RD, McPhail MJ, Sowter D, Antoniadou CG, Vergis N, Vijay GK, Xystrakis E, Khamri W, Shawcross DL, Ma Y, Wendon JA, Vergani D 2012. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14(hi) /CD16(neg) monocytes: Expansion of CD14(hi) /CD16(pos) and contraction of CD14(lo) /CD16(pos) monocytes in acute liver failure. *Cytometry Part A. International Society for Advancement of Cytometry* Jul 26. doi: 10.1002/cyto.a.22104.

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 receptor. *J Intern Med* 261: 511-528.

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: 39-49.

Antinori S, Calattini S, Piolini R, Longhi E, Bestetti G, Cascio A, Parravicini C, Corbellino M 2009. Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? *Am J Trop Med Hyg* 81: 46-51.

Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ 2004. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 136: 341-348.

Arana BA, Navir TR, Arana FE, Berman JD, Rosenkaimer, F 1994. Efficacy of a short course (10 days) of high-dose meglumine antimonate with or without interferon- γ in treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Clin Infect Dis* 18: 381-384.

Arana BA, Mendoza CE, Rizzo NR, Kroeger A 2001. Randomized, controlled, doubleblind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus ethylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 65: 466-470.

² de acordo com Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Aranha FCS, Ribeiro Jr U, Basset P, Corbett CEP, Laurenti MD 2005. Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigote and macrophage infection. *Scand J Immunol* 62: 334-341.

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

Atkinson S, Valadas E, Smith SM, Lukey PT, Dockrell HM 2000. Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG. *Tub Lung Dis* 80: 197-207.

Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27: 669-92.

Azeredo EL, Neves-Souza PC, alvarenga AR, Reis SRNI, Torrentes-Carvalho A, Zagne S-MO, Nogueira RMR, Oliveira-Pinto LM, Kubelka CF 2010. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leukocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology* 130: 202-216.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740.

Baeten D, Boots AM, Steenbakkens PG, Elewaut D, Bos E, Verheijden GF, Berheijden G, Miltenburg AM, Rijnders AW, Veys EM, De Keyser F 2000. Human cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43: 1233-43.

Balestieri FMP, Queiroz ARP, Scavone C, Costa VMA, Barral-Netto M, Abrahamsohn IA 2002. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect* 4: 23-29.

Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG 1995. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 17: 21-28.

Barroso-Freitas APT, Passos SRL, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GPL, Nascimento LD, Marzochi MCA, Marzochi KBF 2009. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 383—389.

- Batoni G, Esin S, Favilli F, Pardini M, Bottai D, Maisetta G, Florio W, Campa M 2005. Human CD56^{bright} and CD56^{dim} natural killer cell subsets respond differentially to direct stimulation with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Scand J Immunol* 62: 498-506.
- Bedoya-Pacheco SJ, Araujo-Melo H, Valete-Rosalino CM, Pimentel MIF, Conceição-Silva F, Schubach AO & Marzochi MCA 2011. Endemic Tegumentary Leishmaniasis in Brazil: Correlation between Level of Endemicity and Number of Cases of Mucosal Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 84: 901–905.
- Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L 2002. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168: 3536-3542.
- Blackwell JM 1999. Tumour necrosis factor alpha and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasitol Today* 15: 73-75.
- Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A 1996. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 84: 188-194.
- Brandau S, Suttman H, Riemensberger J, Seitzer U, Arnold J, Durek C, Jocham D, Flad H-D, Bohle A 2000. Perforin-mediated lysis of tumor cells by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin-activated killer cells. *Clin Cancer Res* 6: 3729-3738.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285: 732-6.
- Cabrera M, Blackwell JM, Castes M, Trujillo D, Convit J, Shaw M-A 2000. Immunotherapy with live BCG plus heat killed *Leishmania* induces a T helper 1-like response in American cutaneous leishmaniasis patients. *Par Immunol* 22: 73-79.
- 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.

- Calvopina M, Gomez EA, Sindermann H, Cooper PJ, Hashiguchi Y 2006. Relapse of New World diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* after miltefosine treatment. *Am J Trop Med Hyg* 75: 1074-1077.
- Castaño D, García LF, Rojas M 2011. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* 91: 348-60.
- Castellano LR, Correia Filho D, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A, Rodrigues V 2009. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Human Immunol* 70: 383-390.
- Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM 2008. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Trop Med Hyg* 78: 122-132.
- Convit J, Pinaridi ME, Rondon AJ 1972. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66: 603-610.
- Convit J, Rondon A, Ulrich M, Bloom B, Castellanos PL, Pinaridi ME, Castes M, Garcia L 1987. Immunotherapy versus chemotherapy in localized cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 21: 401-404.
- Convit J, Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Castes M, Rondon AJ 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 444-448.
- Convit J, Ulrich M, Zerpa O, Borges R, Aranzazu N, Valera M, Villarroel H, Zapata Z, Tomedes I 2003. Immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis in Venezuela, 1990 to 1999. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 469-472.
- Convit J, Ulrich M, Polegre MA, Avila A, Rodriguez N, Mazzedo MI, Blanco B 2004. Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and Bacillus Calmette-Guerin - preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 57-62.

Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães AV, Barreto A C 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg* 89:319-323.

Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P 1998. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 31: 139-142.

Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S-Y, Senechal B, Puel A, Bisvas SK, Moshous D, Picard C, Jais J-P, D´Cruz D, Casanova J-L, Trouillet C, Geissmann F 2010. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375-386.

da Silva R, Sacks DL 1987. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and Immunity* 5: 2802-2806.

Dalbeth N, Gundle R, Davies RJO, Lee YCG, McMichael AJ, Callan MFC 2004. CD56^{bright} NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* 173: 6418-6426.

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

de Castro EA, Luz E, Telles FQ, Pandey A, Biseto A, Dinauski M, Sbalqueiro I, Soccol VT 2005. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana State, Brazil. *Acta Trop.* 93, 141–149.

Desjeux P 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 95: 239–243.

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

- D'Oliveira A, Jr., Machado P, Bacellar O, Cheng LH, Almeida RP, Carvalho EM 2002. Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 7-10.
- Esin S, Batoni G, Pardini M, Favilli F, Bottai D, Maisetta G, Florio W, Vanacore R, Wigzell H, Campa M 2004. Functional characterization of human natural killer cells responding to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *Immunol* 112: 143-152.
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HWL 1993. The novel subset CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82: 3170-3176.
- Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW 1998.. Selective depletion of CD14⁺ CD16⁺ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol* 112: 501-6.
- Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HWL 1996. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87: 373-377.
- Ganguly D, Paul K, Bagchi J, Rakshit S, Mandal L, Bandyopadhyay G, Bandyopadhyay S 2007. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor drives monocytes to CD14^{low}CD83⁺ DCSIGN⁻ interleukin-10-producing myeloid cells with differential effects on T-cell subsets. *Immunology* 121: 499-507.
- Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimarães LH, de Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ 2006. *Scandinavian Journal of Immunology* 63: 70-78.
- Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, de Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP 2007. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 7: 7.
- Gomes NE, Brunialti MK, Mendes ME, Freudenberg M, Galanos C, Salomão R 2010. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Braz J Med Biol Res* 43: 853-8.
- Gomes-Silva A, de Cassia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM 2007. Can interferon-gamma and

interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* 149: 440-444.

Gontijo CM, da Silva ES, de Fuccio MB, Souza MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN 2002. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop*. 81: 143–150.

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

Goto H & Lindoso J A L 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8(4), 419–433.

Han J, Wang B, Han N, Zhao Y, Song C, Feng X, Mao Y, Zhang F, Zhao H, Zeng H 2009. CD14^{high}CD16⁺ rather than CD14^{low}CD16⁺ monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52: 553-559.

Hirsch HH, Kaufmann G, Sendi P & Battegay M. Immune reconstitution in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1159–1166.

Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco SF, Schutz F, Zangger H, Revaz-Breton M, Lye L-F, 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.

Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Makino H 2004. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16⁺ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 1457-67.

Ji J, Sun J, Soong L 2003. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 71: 4278-4288.

Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaró R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF 1987. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis* 156: 73–83.

- Juarez E, Nunez C, Sada E, Elner JJ, Schwander SK, Torres M 2010. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Resp Res* 11:2-14.
- Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H 2002. CD14⁺,CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46: 2578-2586.
- Kima PE 2007. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J for Parasitol* 37: 1087–1096.
- Korkosz M, Bukowska-Strakova K, Sadis S, Grodzicki T, Siedlar M 2012. Monoclonal antibodies against macrophage colony-stimulating factor diminish the number of circulating intermediate and nonclassical (CD14(++)CD16(+)/CD14(+)CD16(++)) monocytes in rheumatoid arthritis patient. *Blood* 119: 5329-30.
- Li G, Hangoc G, Broxmeyer HE 2004. Interleukin-10 in combination with M-CSF and IL-4 contributes to development of the rare population of CD14⁺CD16⁺⁺ cells derived from human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 637-643.
- Liew FY, Li Y, Millott S 1990. Tumor necrosis factor- synergizes with IFN in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145: 4306-4310.
- Lima EB, Porto C, Motta JCO, Sampaio RNR 2007. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana/ *Treatment of American cutaneous leishmaniasis. An Bras Dermatol* 82: 111-24.
- Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, Goto H 2009. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* 160: 311–318.
- Maasho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A, Akuffo H 1998. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infec Immun* 66: 2698-2704.
- Machado- Coelho GLL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhães PA, Mayrink W 2005. Risk factors for mucosal manifestations of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99:55-61.

Machado PR, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho JL, Carvalho EM 2007. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 44: 788-93.

Martinez FO 2009. The transcriptome of human monocyte subsets begins to emerge. *J Biol* 8: 99.

Mayrink W, Magalhães PA, Michalick MSM, da Costa CA, Oliveira Lima A, Melo MN, Toledo VPCP, Nascimento E, Dias M, Genaro O, Hermeto MV, Williams P 1992. Immunotherapy as a treatment of American cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. *Parasitologia* 34: 159-165.

Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Katz S, Barbiéri CL, Uliana SRB 2009. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. *J Antimicrob Chemot* 63: 365–368.

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

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV 2011. 106 p. Ed. Ministério da Saúde. (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmania_hiv_web_25_01_11.pdf)

Miranda-Verástegui C, Llanos-Cuentas A, Arévalo I, Ward BJ, Matlashewski G 2005. Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* 40: 1395-1403.

Mirlashari MR, Lyberg T 2003. Expression and involvement of Toll-like receptors (TLR)2, TLR4, and CD14 in monocyte TNF-alpha production induced by lipopolysaccharides from *Neisseria meningitidis*. *Med Sci Monit* 9: BR316-24.

Moller AS, Ovstebo R, Haug KB, Joø GB, Westvik AB, Kierulf P 2005. Chemokine production and pattern recognition receptor (PRR) expression in whole blood stimulated with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Cytokine* 32: 304-15.

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

Mukbel R, Patten Jr C, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg* 76: 669-675.

Muniz-Junqueira MI, de Paula-Coelho VN 2008. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *Int Immunopharmacol* 8: 1633-8.

Murray H W, Berman J D, Davies C R, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577.

Musa A M, Noazin S, Khalil EAG, Modabber F 2010 Immunological stimulation for the treatment of leishmaniasis: a modality worthy of serious consideration. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 1-2.

Ogonda LA, Orago ASS, Otieno MF, Adhiambo C, Otieno W, Stoute JA 2010. The levels of CD16/Fc receptor IIIA on CD14⁺CD16⁺ monocytes are higher in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia than in children with cerebral or uncomplicated malaria. *Infect. Immunity* 78: 2173-2181.

Oliveira MAP, Pires AS, Bastos RP, Lima GMCA, Pinto SA, Pereira LIA, Pereira AJCS, Abrahamsohn IA, Dorta ML, Ribeiro-Dias F 2010. Leishmania spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 52: 83-8.

Pereira LIA, Dorta ML, Pereira AJCS, Bastos RP, Oliveira MAP, Pinto SA, Galdino Jr H, Mayrink W, Barcelos W, Toledo VPCP, Lima GMCA, Ribeiro-Dias F 2009. Case report: increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/Leishmania antigens. *Am J Trop Med Hyg* 81: 378-383.

- Pinheiro RO, Pinto EE, Benedito AB, Lopes UG, Rossi-Bergmann B 2004. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. *An Acad Bras Cienc* 76: 519-527.
- 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.
- Posada-Vergara MP, Lindoso JAL, Tolezano JE, Pereira-Chiocola VLP, Silva MV, Goto H 2005. Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome in 2 patients with AIDS. *J Infect Dis* 192: 1819–1822.
- Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 70: 4638-4642.
- Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schäkel K 2002. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med* 196: 517-527.
- Reis LC, Brito MEF, Souza MA, Medeiros ACR, Silva CJ, Luna CF, Pereira VRA 2009. Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. *J Clin Lab Anal* 23: 63-69.
- Reithinger R, Dujardin JC 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J. Clin. Microbiol* 45: 21–25.
- Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM 1998. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 31: 143-148.
- Romero GA, de la Gloria Orge M, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira Macedo V, de Carvalho EM 2005. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop* 93: 49-56.
- Rosa MEA & Machado PRL 2011. Disseminated Leishmaniasis: Clinical, Immunological and Therapeutic Aspects. *Drug Development Research* 72: 437–441.
- Sassi A, Louzir H, Ben Salah A, Mokni M, Ben Osman A, Dellagi K 1999. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or

asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clin. Exp. Immunol* 116: 127–132.

Scharton TM, Scott P 1993. Natural killer cells are a source of interferon that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* 178: 567-577.

Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araujo ML, Souza WJS, Haddad F, Perez MA, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG, Marzochi MCA, Marzochi KBF, Costa SCG 2001. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 987–996.

Scott P 2011. Leishmania – a parasitized parasite. *N Engl J Med* 364(18): 773-774.

Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421-52.

Serbina NV, Cherny M, Shi C, Bleau SA, Collins NH, Young JW, Pamer EG 2009. Distinct Responses of Human Monocytes Subsets to *Aspergillus fumigatus* Conidia. *The Journal of Immunology* 183: 2678-2687.

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

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, Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CEP 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 423-431.

Sinha S, Fernandez G, Kapila R, Lambert WC & Schartz RA 2008. Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *International Journal of Dermatology* 47: 1263–1270.

Skinner NA, MacIsaac CM, Hamilton JA, Visvanathan K 2005. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14^{dim}CD16⁺ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin Exp Immunol* 141: 270-278.

Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J 2008. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 67: 152-159.

Smedan C, Ernemar T, Gudmundsdotter L, Gille-Johnson P, Somell A, Nihlmark K, Gårdlund B, Andersson J, Paulie S 2011. FluoroSpot analysis of TLR-activated monocytes reveals several distinct cytokine secreting subpopulations. *Scand J Immunol* 75: 249-258.

Snider H, Lezama-Davila, Alexander J, Satoskar AR 2009. Sex Hormones and Modulation of Immunity against Leishmaniasis. *Neuroimmunomodulation* 16:106–113.

Soares G, Barral A, Costa JM, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J 2006. CD16⁺ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased *ex vivo* levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol* 79: 36-9.

Sotto MN, Yamashiro-Kanashiro EH, da Matta VL, de Brito T 1989. Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. *Acta Trop* 46: 121–130.

Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H 2004. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 38: 1266-1272.

Suttman H, Jacobsen M, Reiss K, Jochem D, Bohle A, Brandau S 2004. Mechanisms of bacillus Calmette-Guerin mediated natural killer cell activation. *J Urol* 172: 1490-1495.

Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeffner-Cavaillon N 1995. CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol* 25: 3418-3424.

Toledo VPCP, Mayrink W, Gollob KJ, Oliveira MAP, Costa CA, Genaro O, Pinto JA, Afonso LCC 2001. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 89-98.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. Dec15; 186: 1829-34.

Van Der Snoek EM, Robinson DJ, Van Hellemond JJ, Neumann HAM 2008. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *J Eur Ac Dermatol Venereol* 22: 918-922.

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

Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW, Billah MM 1994. Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood* 83: 2678-83.

Weigle KA, de Davalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'Alessandro A 1987. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg* 36: 489-496.

WHO. The world health report 2004. Changing history. <http://www.who.int/whr/2004/en/index.html> (accessed September 12, 2011).

Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, Wong SC 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118: 16-31.

Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC 2012. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 53: 41-57.

Yano R, Yamamura M, Sunahori K, Takasugi K, Yamana J, Kawashima M, Makino H 2007. Recruitment of CD16⁺ monocytes into synovial tissues is mediated by fractalkine and CX3CR1 in rheumatoid arthritis patients. *Acta Med Okayama*. 61: 89-98.

Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, Heine GH 2011. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50-61.

Zerpa O, Ulrich M, Blanco B, Polegre M, Avila A, Matos N, Mendoza I, Pralong F, Ravel C, Convit J 2007. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Brit J Dermatol* 156: 1328-1335.

Ziegler-Heitbrock HW, Ströbel M, Kieper D, Fingerle G, Schlunck T, Petersmann I, Ellwart J, Blumenstein M, Haas JG 1992. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood* 79: 503-11.



Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, Passlick B, Pforte A 1993. The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol*. 23: 2053-2058.

Ziegler-Heitbrock HWL 1996. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺ CD16⁺ subpopulation. *Immunol Today* 17: 424-428.

Ziegler-Heitbrock HWL 2007. The CD14⁺CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81: 584-592.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116: 74-80.

ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA, TCLE

		PROTOCOLO Nº 164 / 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 das subpopulações de monócitos pro e antiinflamatórios 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, 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.

Data de apresentação ao CEP: 05/12/2008

III - Objetivos do projeto: Avaliar o papel das subpopulações de monócitos pro e antiinflamatórios na infecção humana causada por *Leishmania (V.) braziliensis*. Para isso serão **quantificadas** as sub populações de monócitos CD14⁺CD16⁺ (pro inflamatórios) e CD14⁺CD16⁻ (antiinflamatórios) do sangue periférico de pacientes com LTA infectados com *L. (V.) braziliensis*, antes e após tratamento, comparando com indivíduos saudáveis e estabelecendo correlação entre os resultados obtidos e os dados clínicos dos pacientes. Serão **avaliadas** a expressão das citocinas TNF e IL-10 nos monócitos pro e antiinflamatórios do sangue periférico de pacientes infectados, antes e após tratamento; **determinadas** a produção de TNF e IL-10 em culturas de sangue periférico de pacientes infectados, antes e após tratamento, comparando as respostas com aquelas de indivíduos saudáveis. Serão **avaliadas** ainda a expressão de CD14, CD16, TNF e IL-10 nas lesões dos pacientes infectados, antes de iniciar o tratamento e **correlacionadas** a frequência de monócitos pro e antiinflamatórios do sangue periférico, antes e depois do tratamento, com a evolução clínica.

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.
- ❑ **Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):** Serão utilizados camundongos deficientes em interferon gama de ambos os sexos com idade entre 60 e 120 dias cujas matrizes são oriundas do ICB/UFG e mantidos atualmente no Biotério do IPTSP/UFG . O número de animais depende do número de biópsias, porém o número previsto é de 60 animais (2 animais por biópsia). Mantidos em gaiolas com dois camundongos por grupo (cada grupo é originado de um macerado de biópsia que será inoculado). Neste caso, o número de animais deve e pode ser determinado previamente, uma vez que ficou estabelecida a utilização de 30 pacientes humanos.
- ❑ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade):** Os animais serão mantidos em gaiolas apropriadas para camundongos 20X30 no Biotério do IPTSP/UFG contendo dois camundongos por gaiola. A luminosidade é controlada por fotoperíodo de 12 horas e a temperatura, intensidade de ruído e a umidade relativa do ar serão as do ambiente geral, o qual é melhorado por mecanismo de exaustão de ar.
- ❑ **Alimentação/hidratação:** Os animais alimentam-se de ração autoclavável, especial para camundongos, e recebem água à vontade sendo esta acidificada e autoclavada.
- ❑ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada:** Os animais serão inoculados com macerado de biopsias de pacientes suspeitos de estarem infectados com leishmania e serão mantidos por até 3 meses para observação de presença de lesão. Caso ocorra o aparecimento de uma lesão visível de aproximadamente 1 mm os animais serão imediatamente sacrificados para obtenção do parasito.
- ❑ **Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:** Os animais serão manipulados sempre pela mesma pessoa tecnicamente habilitada e sempre no mesmo período. Os ruídos, dentro e fora da sala, serão controlados dentro do possível. A manutenção dos animais infectados encontra-se fisicamente separada da sala de manipulação dos animais que contribui de forma relevante a diminuir o grau de estresse destes. Os animais serão observados diariamente para garantir que nenhuma anomalia esteja acontecendo e que a gravidade da infecção não cause maiores

dificuldades na vida do animal. Caso ocorra alguma anormalidade com algum animal durante o experimento, este será imediatamente sacrificado para garantir que não ocorram sofrimentos maiores a este e aos animais adjacentes.

- ❑ **Método de eutanásia (se for o caso):** O sacrifício será feito por decapitação após anestesia com associação de 1 mg de xilazina e 0,1 mg de cetamina intraperitoneal 30 minutos antes do sacrifício. A escolha deste método é porque, após a anestesia, o método possibilita uma grande certeza de óbito do animal.
- ❑ **Destino do animal:** Questiona-se o destino dos animais que não apresentarem lesões no período de 3 meses. Como confirmar se este foi ou não infectado e apenas não demonstra, ainda, lesões características?

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 2 TCLEs formatados de forma distinta, com textos semelhantes, sendo que em um deles (Banco de Sangue) está descrito como orientação para esclarecimento de dúvidas sobre os direitos do sujeito, o contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFG. Neste mesmo TCLE encontra-se em branco no corpo do texto o nome da pesquisadora participante do projeto que aplicará o questionário naquele momento, podendo gerar confusão ao sujeito que pode não entender o conceito de grupo de pesquisa e / ou pesquisador responsável e ausência do mesmo naquele momento.
- ❑ **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



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 das subpopulações de monócitos pro e antiinflamatórios na infecção causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Pesquisador Responsável:
Fátima Ribeiro Dias

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

Pesquisadores participantes:

- **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); **Aline Carvalho Batista** – professora/pesquisadora – Faculdade de Odontologia/UFG; **Lucianna Gonçalves Nepomuceno** (aluna de graduação em Biomedicina/UFG); **Walbert Pires de Oliveira Júnior** (aluno de graduação em Biomedicina/UFG); **Ildfonso Alves da Silva Junior** (aluno de graduação em Biomedicina/UFG); **Nathália Ferreira Lima** (aluna de graduação em Ciências Biológicas/UFG); **Denisy Marquesa Mendanha** (aluna de graduação em Biomedicina/UFG)

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

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

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

- Pesquisa com risco mínimo.

Neste estudo pretendemos entender melhor como as pessoas que têm leishmaniose se defendem da doença e identificar o agente que causa a doença. Uma das formas que podemos fazer isso é estudando as células e seus produtos que participam da resposta contra

o parasito. Portanto, nós estaremos pesquisando no sangue dos voluntários a presença de determinadas subpopulações das células sanguíneas, utilizando métodos já existentes. Na biópsia (um pedaço da lesão) iremos isolar e identificar o agente causador da doença e as características da lesão e das células ao microscópio. **A sua colaboração nesse sentido seria a de permitir que o material que será coletado para exames de diagnóstico (sangue e biópsia) possam ser utilizados em pesquisas de células e proteínas (produtos químicos produzidos pelas células) relacionadas com a presença do agente causador da doença.** A retirada do sangue e da biópsia são procedimentos necessários para que seja feito o diagnóstico de leishmaniose, entretanto, estamos pedindo a sua autorização para retirar o dobro de sangue daquele coletado para diagnóstico (10 mL ao invés de 5 mL) e reservar este material para pesquisar estas células e proteínas. A colheita do sangue será realizada após o diagnóstico e durante o acompanhamento do tratamento, até o final deste. Os parasitos obtidos serão estocados no Leishbank, o banco imunobiológico de leishmanioses, do Laboratório de Imunobiologia das leishmanioses, para futuro 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 das subpopulações de monócitos pro e antiinflamatórios 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: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE
PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a) de uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre 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.

I-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Avaliação das subpopulações de monócitos pro e antiinflamatórios na infecção causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis***

2. **PESQUISADO** : Fátima Ribeiro Dias

CARGO/FUNÇÃO: Professor - Pesquisador

3. **AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA**: risco mínimo

4. **DURAÇÃO DA PESQUISA**: 6 anos

II- REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE/DOADOR OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA. CONSIGNANDO:

Neste estudo pretendemos entender melhor como as pessoas que têm leishmaniose se defendem da doença e identificar o agente que causa a doença. Uma das formas que podemos fazer isso é estudando as células e seus produtos que participam da resposta contra o parasito. Portanto, nós estaremos pesquisando no sangue dos voluntários saudáveis a presença de determinadas subpopulações das células sanguíneas, utilizando métodos já existentes, e como estas células respondem a antígenos dos parasitos. A sua colaboração nesse sentido, seria a **doação de cerca de 20 mL de sangue obtida por punção venosa**. Esclarecemos que esta quantidade será obtida seguindo a colheita da bolsa de sangue, não sendo necessária uma nova punção. A punção sanguínea pode lhe causar um leve desconforto e dor pela picada da agulha, mas nenhum risco maior. O material será colhido uma única vez e será usado para pesquisar as células e proteínas. Os resultados obtidos poderão acrescentar informações importantes no conhecimento da doença, que poderá beneficiar no futuro todas as pessoas que estão expostas à leishmaniose. Você poderá pedir a retirada deste material do nosso estoque a qualquer momento e deixar de participar do estudo, além de pedir qualquer informação sobre os procedimentos, riscos e dúvidas relacionadas à pesquisa, utilizando os telefones para contato. Finalmente, gostaríamos de dizer que os resultados obtidos serão publicados em congressos e revistas especializadas, onde não terá nenhuma informação capaz de fazer a sua identificação como componente do grupo de pesquisa e esclarecer que não existe neste projeto um ressarcimento planejado aos pacientes/doadores, mesmo que os resultados obtidos e divulgados venham a receber premiações, já que não há nenhum ônus para o paciente para a execução da pesquisa, nem riscos diretos previstos oriundos da pesquisa.

III- ESCLARECIMENTOS SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. tratamento é gratuito.
3. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
4. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
5. disponibilidade de assistência nos serviços de saúde, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa
6. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa

IV. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA. PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS: Dra. Ledice

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

V. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

I. NOME DO PACIENTE/DOADOR SAUDÁVEL.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE N^o:.....**SEXO:** M F
DATA NASCIMENTO:.....V...../.....

ENDEREÇO.....**No**.....**APTO:**.....

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

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

RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... **Gênero:** M F

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

ENDEREÇO.....**N^o**.....**APTO:**.....

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

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

VI- CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

Goiânia,.....de.....20.....

*Assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal.....*

*Fátima Ribeiro Dias
Pesquisadora*

ANEXO 2: Tipos de lesões encontradas nos pacientes



Paciente	Idade (anos)	Gênero	Local de contágio	Forma clínica	Tempo de lesão	Nº de lesões	Tamanho da lesão (cm)	PCR-RFLP	Histopatológico (presença de amastigota)	IDRM (mm)	RIF
ADS9	22	M	Vista Alegre – RO	LC	6	1	2	L (V)	Sim	17	Neg
AAG9	23	M	Cruzeiro do Sul - AC	LC	1	1	0,3	L (V)	Pos	3	Neg
BDO9	25	F	Canarana - MT	LC	0,5	1	3	L (V)	Pos	15	Neg
BUSN10	54	M	Sant Cruz do Xingu - MT	LC	2	2	1 a 3	L (V)	Pos	Neg	1\40
CDM10	65	M	Barra do Garças - MT	LC	8	10	0,2 a 1	NR	Pos	10	1\40
DAA10	22	M	Parauna - GO	LC	24	12	3 a 5	L (V)	Pos	18	NR
DLP9	63	M	Ribamar/MA	LC	18	4	1 a 3	L (V)	Pos	17	Neg
ELA9	36	M	Caldas Novas/GO	LC	22	1	0,5	L (V)	Pos	Neg	Neg
EFA9	47	M	Baliza/GO	LC	1,5	1	2,5	L (V)	Neg	15	Neg
ELS11	27	F	Aparecida de Goiânia/GO	LC	1	1	2	NR	Neg	15	1\40
FSMF10	19	M	Pedra Preta/MT	LC	1,5	1	3	Neg	Pos	Neg	NR
FCS9	44	M	Colmeia - TO	LC	4	7	0,5 a 1	Neg	Pos	9	1\40
FPS10	36	M	Açailândia/MA	LC	6	10	0,5 a 5	Neg	Pos	20	1\40
GRM10	19	M	Redenção/PA	LC	3	2	2 e 3	L (V)	Neg	5	Neg
GAMC10	31	F	Crixás/GO	LC	7	1	3	L (V)	Neg	27	1\40
GPZ	55	M	S. José dos Bandeirantes/GO	LC	2	14	0,5 a 5	NR	Neg	NR	NR
HPB12	35	M	Jussara/GO	LC	1,5	8	0,5 a 4	NR	Pos	12	1\160
JCAM9	39	M	Barra do Garças/MT	LC	0,5	5	0,5	Neg	Pos	NR	NR
JCS10	29	F	Ulianópolis/PA	LC	10	5	0,5 a 2	L (V)	Pos	22	Neg
JLR12	52	M	Barra do Corda/MA	LC	12	3	0,5 a 4	NR	Pos	Neg	Neg
JM9	45	M	Araguapaz/GO	LC	4	2	0,5 a 2	Neg	Neg	35	Neg
KPS11	21	M	Manaus/AM	LC	2	1	0,2	L (V)	Neg	10	1\80
MLB10	50	F	Montividiu do Norte/GO	LC	4	2	0,5 a 2	L (V)	Neg	10	1\40
MHRN10	53	F	Jataí/GO	LC	6	1		L (V)	Neg	20	Neg
RCD10	18	M	Goianésia/GO	LC	3	3	2 a 8	L (V)	Pos	7	Neg
SPC10	63	M	Orizona/GO	LC	3	4	2	L (V)	Neg	Neg	1\80
SPS10	47	M	Itaberaí/GO	LC	24	1	5	L (V)	NR	10	1\160
VGS10	21	M	Manaus/AM	LC	2	1	1	L (V)	Pos	12	1\40
VJS10	46	M	Campestre/GO	LC	5	1	7	L (V)	Neg	20	1\40
WFS11	18	M	Araguacema/TO	LC	1	1	3	NR	Pos	NR	NR
WGS9	33	M	Santa Helena/RR	LC	6	2	1 a 2	Neg	Pos	NR	NR
WJL9	22	M	Porto da Mata/MT	LC	4	1	6	NR	Pos	NR	1\40

M – masculino. F – feminino. LC – Leishmaniose cutânea localizada. L (V) – *Leishmania Viannia*. NR – não realizado. Pos – positivo. Neg – negativo. IDRM – intradermorreação de Montenegro. RIF – reação de imunofluorescência indireta

ANEXO 3: Dados do pacientes

ANEXO 4: Publicações durante o curso de doutorado

Improvements in obtaining New World *Leishmania* sp from mucosal lesions: Notes on isolating and stocking parasites. Dorta ML, Oliveira MA, Fleuri AK, Duarte FB, Pinto SA, **Pereira LIA**, Ribeiro-Dias F. Exp Parasitol. 2012 Jun 21.

A dysflagellar mutant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. Zauli RC, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Moura AS, **Pereira LIA**, da Silva IA Jr, Lemes LG, Dorta ML, de Oliveira MA, Pitaluga AN, Ishikawa EA, Rodrigues JC, Traub-Cseko YM, Bijovsky AT, Ribeiro-Dias F, Uliana SR. Parasit Vectors. 2012 Jan 11;5:11. doi: 10.1186/1756-3305-5-11.

Clinical isolates of New World *Leishmania* from cutaneous and visceral leishmaniasis patients are uniformly sensitive to tamoxifen. Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JK, **Pereira LIA**, Jerônimo SM, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR. Int J Antimicrob Agents. 2011 Jul;38(1):93-4.

Allelic polymorphism of human FcγRIIA-H/R131 receptor in American tegumentary leishmaniasis. Oliveira CR, **Pereira LIA**, Pereira AJ, Ferreira AA, Crespo AM, Silveira LA. Int J Immunogenet. 2011 Jun;38(3):225-31. doi: 10.1111/j.1744-313X.2011.00997.x.

Leishmania spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. Oliveira MA, Pires Ada S, de Bastos RP, Lima GM, Pinto SA, **Pereira LIA**, Pereira AJ, Abrahamsohn Ide A, Dorta ML, Ribeiro-Dias F. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010 Mar-Apr;52(2):83-8.

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

Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens. **Pereira LIA**, Dorta ML, Pereira AJ, Bastos RP, Oliveira MA, Pinto SA, Galdino H Jr, Mayrink W, Barcelos W, Toledo VP, Lima GM, Ribeiro-Dias F. Am J Trop Med Hyg. 2009 Sep;81(3):378-83.

ANEXO 5: TRAJETÓRIA DE VIDA ACADÊMICA

Ao terminar o curso de Medicina na FM/UFG em 1973 decidi pela Residência Médica em Doenças Infecciosas e Parasitárias no Departamento de Medicina Tropical/IPTSP/UFG. Pensei que seria mais útil aos pacientes que sofriam com doenças como Poliomielite, Difteria, Coqueluche, Sarampo, Meningite, Febre Amarela, Malária, Esquistossomose, Leishmanioses, Paracoccidioidomicose, entre outras. Neste período tive professores como William Barbosa, Joaquim Caetano de Almeida Neto, Geovane Cysneiros, Roberto Daher e Wanderlei Pitaluga que reforçaram o meu interesse pela Medicina Tropical e pela carreira acadêmica. A Residência Médica foi complementada por um curso de especialização de grande importância regional que era ministrado pelo Departamento de Medicina Tropical (DMT/IPTSP/UFG).

Em dezembro de 1975 prestei concurso para professor auxiliar de ensino no DMT/IPTSP/UFG e ao mesmo tempo fui admitida como médica no Hospital Oswaldo Cruz, hoje hospital de Doenças Tropicais/SES/GO. Era época da epidemia de meningite e faltavam especialistas na área. Tempos difíceis em que se contava especialmente com os dados clínicos. Não existiam Unidades de Terapia Intensiva e os recursos laboratoriais eram limitados. Quantos plantões desesperadores acompanhando casos de poliomielite em pulmões de aço, realizando traqueostomias em pacientes com difteria, assistindo pacientes com raiva e assim por diante.

Com incentivo e orientação do Prof William Barbosa me matriculei em 1976 na primeira turma do Mestrado em Medicina Tropical/IPTSP/UFG e obtive o grau de mestre em 1979 com o trabalho: Leishmaniose Tegumentar – Estudo terapêutico baseado nos aspectos clínicos e imunológicos.

De 1983 a 1991 fui diretora técnica e de 1991 a 1995, diretora geral do HDT. Neste período destaque: humanização do hospital com liberação de visitas diárias e a presença de acompanhantes, criação dos serviços de controle de infecção hospitalar, psicologia e farmácia hospitalar, realização de programas de treinamento em serviço e ampliação da área física.

Outras atividades desenvolvidas nas décadas de 80 e 90: curso de especialização em Políticas de Saúde e Administração de Serviços de Saúde (convênio IPTSP/UNICAMP); treinamento oferecido pelo Ministério da Saúde para atendimento de pacientes com Cólera em Iquitos – Peru e estágio no hospital do Instituto Pasteur em Paris em 1993 para o atendimento de pacientes com HIV/AIDS em hospital dia e no domicílio (convênio Ministério da Saúde/Governo francês).

Após curso de Controle de infecção hospitalar (Ministério da Saude/OPAS) em 1984, trabalhei no treinamento de profissionais de saúde para o controle das infecções hospitalares no sentido de implantar comissões para o controle de infecção hospitalar nos hospitais do estado de Goiás. Iniciamos um grupo de estudo no hospital das Clínicas: Paulo Prado, Manoel Maria, Milca Severino Pereira, Lílian Joy W. Antunes de Oliveira e José Mário. Em 1985, organizamos a capacitação de monitores para treinamento dos profissionais a nível regional. No período de 1985 a 1992 coordenei o treinamento de 913 profissionais de nível superior: 509 médicos, 286 enfermeiros, 78 farmacêuticos/bioquímicos e 40 de outras áreas da saúde; 84,6% dos treinados trabalhavam em Goiânia e 15,4% em cidades do interior de Goiás e Tocantins. Foi um trabalho que contribuiu para a mudança de comportamento dos profissionais de saúde nos hospitais goianos e para a formação de especialistas na área.

Em 1991 foi fundada a Associação Goiana de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar (AGECIH), da qual fui a primeira presidente. Em 1995 participei juntamente com Anita Bernardes da Silva, Ivete Vieira Gomes, Marta Antunes de Souza e Catarina de Fátima Vieira Mesquita da elaboração do manual: Rotinas Básicas para o Controle de Infecções Hospitalares.

Participei ativamente da organização da primeira Jornada Goiana de Controle de Infecção em agosto de 1993, marco histórico para o controle de infecção hospitalar no nosso estado, do XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical em 1996 em Goiânia e do XIII Congresso Brasileiro de Infectologia em 2003 em Goiânia.

Juntamente com o colega João Guimarães organizamos em 1977 um manual de rotinas médicas no sentido de uniformizar as condutas dos médicos, residentes e internos do curso de medicina durante estágio no HDT. A partir daí o manual foi

ampliado, com a participação dos médicos do HDT e dos professores do DMT. A sétima edição (2012) do Manual Prático de Doenças Transmissíveis foi lançada recentemente.

No período de 1997 a 2001 assumi a chefia do DMTD/IPTSP/UFG e entre 2007 e 2009, a vice-chefia. E a convite do prof Luquetti tenho participado nos últimos anos da Revista de Patologia tropical como editor associado.

Na academia, tenho me dedicado ao ensino e ao atendimento de pacientes portadores de doenças transmissíveis, principalmente aqueles com doenças endêmicas, atuando especialmente na integração ensino-serviço no Hospital de Doenças Tropicais (HDT) e contribuindo assim para a formação de internos e residentes de infectologia. Ao mesmo tempo tenho participado da publicação de vários capítulos de livros (Antibioticoprofilaxia em situações clínicas, Leishmaniose Tegumentar, Leishmaniose Visceral, Dengue, Febre Amarela, Cólera, entre outros).

Tenho trabalhado também em projetos de extensão, na organização de cursos e treinamentos além de participar da Comissão de Residência Médica do Hospital das Clínicas/UFG, da Comissão de Residência Médica do Hospital de Doenças Tropicais – SES/GO e da Comissão de Antirretrovirais da SES/GO.

Desde 1978 participo do programa de residência médica em infectologia – HC/UFG, como preceptora em atividades práticas e teóricas ou como supervisora. Assim, tenho contribuído para a formação da grande maioria dos infectologistas que atuam no estado de Goiás.

No início da década passada iniciei um trabalho conjunto com a profa Miriam L. Dorta, em seguida enriquecido pela participação dos profs Fátima Ribeiro-Dias e Milton A. P. Oliveira e pela equipe do Laboratório de Imunologia/IPTSP/UFG. Demos então início ao projeto Banco Imunobiológico das Leishmanioses da Região Centro-Oeste. Desde então outros projetos foram elaborados e as publicações surgiram naturalmente, inclusive em parceria com os profs Wilson Mayrink e Vicente Toledo (UFMG) e Silvia Uliana e Glória Collet (USP) e, então, o incentivo para a realização do doutorado em Medicina Tropical.

