



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**CONTRIBUIÇÃO DAS DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES DE
MONÓCITOS PARA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Rúbia Suely Santana Costa

Dissertação de Mestrado

Salvador – (Bahia), 2012

C837 Costa, Rúbia Suely Santana.

Contribuição das diferentes subpopulações de monócitos para a resposta inflamatória na leishmaniose cutânea / Rúbia Suely Santana Costa. – Salvador, 2012.

104 f.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho.

Co- Orientadora: Dr^a. Sara Timóteo Passos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Medicina da Bahia, 2012.

1. Leishmaniose. 2. Subpopulações de Monócitos. 3. Imunopatologia. I. Carvalho, Lucas Pedreira de. II. Passos, Sara Timóteo. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616.993.161



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**CONTRIBUIÇÃO DAS DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES DE
MONÓCITOS PARA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Rúbia Suely Santana Costa

Orientador: Lucas Pedreira de Carvalho

Co-orientadora: Sara Timóteo Passos

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em imunologia e Doenças Infecciosas.

Salvador – (Bahia), 2012

FONTES DE FINANCIAMENTO

- National Institute of Health - NHI

- International Collaborations in Infectious Disease Research –

Grant AI088650-01

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES:

- Jmary Oliveira Filho, Professor adjunto de Neuroanatomia –UFBA e Professor do Programa de Pós- graduação em Ciências da Saúde – UFBA.
- Luciana Santos Cardoso, Professora auxiliar da Universidade Estadual da Bahia- UNEB e Pesquisadora associada do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos – HUPES – UFBA.
- Lis Ribeiro do Valle Antonelli, Assistente de pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz -FICRUZ de Minas Gerais.

MEMBROS SUPLENTE

- Lucas Pedreira de Carvalho (Professor - orientador), Professor adjunto de Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde - UFBA e Professor do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde -UFBA.

*“As palavras só têm sentido se nos ajudam a ver o mundo melhor.
Aprendemos palavras para melhorar os olhos.”*

*"Há muitas pessoas de visão perfeita que nada vêem...
O ato de ver não é coisa natural.
Precisa ser aprendido!"*

(Rubem Alves)

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus por ser Supremo, Senhor e Rei.

Aos meus pais, Maria Damiana e Gildázio Braga pelo apoio e compreensão e por me ensinar a viver com humildade. Sou eternamente grata.

A minha filha, Mara Costa por entender minha ausência e por todos os sonhos que ainda vamos alcançar.

Ao meu irmão e amigo, Ruben da Costa, pelo apoio incondicional nesta caminhada. MUITÍSSIMO obrigada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Lucas Carvalho e Sara Passos

A quem quero agradecer pelos ensinamentos que vão muito além das palavras

Pela paciência, respeito, carinho e amizade.

Agradeço pela oportunidade de fazer parte de seu convívio e por vocês serem para mim a prova de que o crescimento depende da dedicação

Por serem ótimos pesquisadores

Obrigada por orientar para a vida

AGRADECIMENTOS

A Dr. Edgar Carvalho, pela oportunidade por fazer parte da equipe do Serviço de Imunologia. Agradeço eternamente.

A Samir Elias Kalil, pelas incontáveis horas que ouviu sobre imunologia e *Leishmania*, pelo carinho, incentivo e por fazer parte da minha vida.

As minhas irmãs, meu agradecimento pelo apoio, compreensão, incentivo, por cuidarem de minha filha durante a minha ausência, além da sincera amizade, amo vocês!

Aos médicos pesquisadores do Serviço de Imunologia que dá suporte clínico avaliando os pacientes em Corte de Pedra

A toda equipe do Serviço de imunologia do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos pela coletividade e auxílio prestado. Em particular aos amigos do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Lucas Almeida, Daniela Celestino, Jessé Alves pela ajuda e atenção.

A Andréa Magalhães, pelo carinho, disponibilidade e sabedoria em conduzir ensinamentos, sempre. Eternamente grata.

A Taís Menezes e Giovana Franciscon pelo coleguismo e colaboração em muito dos experimentos realizados. Obrigada pela ajuda.

Aos funcionários do Serviço de Imunologia, pela cooperação constante e disponibilidade, em particular: Cristiano Sampaio, Orlando Sanches, Dilma Simplício e Érica Castilho.

Aos pacientes da endêmica por participarem deste estudo. Obrigada por colaborarem com a nossa pesquisa.

Aos meus queridos familiares, Arnaldo, Marcos, Cecília, Norma, Celeide por também fazerem parte desta conquista.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
ÍNDICE DE FIGURAS	14
I. Resumo	15
II. Objetivos	16
II. 1 Objetivo Geral	16
II. 2 Objetivo Específicos	16
III. Introdução	17
IV. Referencial Teórico	19
IV.1 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	19
IV.2 Transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana	21
IV.3 Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana	21
IV.4 Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana	23
IV.5 Características das Subpopulações de monócitos nas doenças inflamatórias	27
IV.6 Participação dos monócitos/macrófagos na leishmaniose	31
V. Casuística, Material e Métodos	33
V.1 Área endêmica em leishmaniose	33
V.2 Desenho de estudo	34
V.3 Definições de Casos	35
V.3.1 Leishmaniose cutânea recente (LCR)	35
V.3.1 Leishmaniose cutânea (LC)	35
V.3.3 Indivíduos Sadios (IS)	35
V.4 Critérios de Inclusão	35
V.5 Critérios de Exclusão	36
V.6 Metodologia	36
V.6.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	36
V.6.2 Marcação de superfície celular <i>ex-vivo</i>	37
V.6.3 Preparação das biópsias para marcação de superfície	37

V.6.4 Marcação Intracelular	38
V.6.4 Preparação da <i>Leishmania</i> para infecção-Cepa 11245 de <i>L.braziliensis</i>	38
V.6.4 Dosagem de CCL2	39
V.6.4 Fluxograma	40
V.7 Análises dos Dados	41
V.8 Considerações Éticas da Pesquisa	41
VI Artigo	42
VII Resultados	61
VIII Discussão	68
XIX Perspectivas De Estudo	73
X Conclusão	74
XI Summary	75
XII Referências Bibliográficas	85
XIII Anexos	
Anexo 1- Termo de Consentimento Informado para Pacientes	
Anexo 2- Termo de Consentimento Informado para menores de 18 anos	
Anexo 3- Termo de Consentimento Informado para Responsáveis/Guardiões de menores de 18 anos	
Anexo 4- Termo de Consentimento Informado para Controles Sadios	
Anexo 5- Normas para elaboração de artigo da revista <i>The Journal of Immunology</i>	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Allophycocyanin (aloficocianina)
CCL2/MCP-1	Proteína-1 quimioatraente de monócitos
CD4	Grupo de Diferenciação 4
CD8	Grupo de Diferenciação 8
CD14	Grupo de Diferenciação 14
CD16	Grupo de Diferenciação 16
CD14⁻CD16⁺⁺	Monócitos Clássicos
CD14⁺CD16⁺	Monócitos Intermediários
CD14⁺CD16⁺⁺	Monócitos Não-Clássicos
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunológico)
FITC	Isocianato de fluoresceína
IDRM	Intradermo reação de Montenegro
IFN-γ	Interferon-gamma
iNOS	Síntese Induzível de óxido nítrico
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC II	Complexo de Histocompatibilidade Principal II
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PE	Ficoeritina
SLA	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
SVS	Secretaria de Vigilância da Saúde
Th1	Linfócitos T “helper” auxiliar tipo 1
Th2	Linfócitos T “helper” auxiliar tipo 2
TLR	Receptor “Toll-like”
TNF	Fator de Necrose Tumoral

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Níveis de TNF são elevados nos pacientes com leishmaniose cutânea. 62
- Figura 2.** Monócitos são importantes fontes celulares para produção de TNF em infecção por *L. braziliensis*. 63
- Figura 3.** Caracterização das diferentes subpopulações de monócitos no sangue de pacientes infectados com *L. braziliensis* e indivíduos sadios. 64
- Figura 4.** Avaliação do grau de ativação das diferentes subpopulações de monócitos de pacientes infectados com *L. braziliensis* e indivíduos sadios. 65
- Figura 5.** Monócitos clássicos e intermediários são as principais células produtoras de TNF. 66
- Figura 6.** Expressão elevada de CCL2 em pacientes com leishmaniose cutânea. 67
- Figura 7** Frequência de CD14 e CD16 em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea. 68

I. RESUMO

A leishmaniose cutânea (LC) é uma doença parasitária inflamatória caracterizada pela presença de lesões ulceradas na pele. Pacientes com LC infectados por *L. braziliensis* produzem altos níveis de TNF, citocina que contribui para dano tecidual e desenvolvimento da úlcera. Infiltrado de células mononucleares é encontrado na lesão de pacientes com LC, com presença de linfócitos T e B e fagócitos mononucleares. A maioria dos trabalhos tem dado ênfase à resposta imune das células T e pouca atenção tem sido dada para a contribuição de monócitos na imunopatologia observada na LC. Recentemente, três subpopulações de monócitos, foram descritas baseadas na expressão das moléculas CD14 e CD16: Monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺⁺CD16⁺). **Objetivo** deste estudo foi caracterizar fenotipicamente e funcionalmente as subpopulações de monócitos de pacientes com LC. **Material e Método:** Células mononucleares do sangue periférico foram obtidas de indivíduos saudáveis, pacientes com leishmaniose cutânea com lesão recente (LCR) e paciente com leishmaniose cutânea com úlcera estabelecida. A caracterização das subpopulações de monócitos foi determinada por citometria de fluxo. **Resultados:** Nós observamos que a frequência das populações de monócitos intermediários e não-clássicos estavam aumentadas em indivíduos com LCR e em pacientes com LC. Expressão de MHC classe II foi aumentada em monócitos intermediários, sugerindo que essas células podem apresentar antígeno para células T. Também observamos que monócitos clássicos e intermediários produzem mais TNF que os não-clássicos em resposta a antígeno solúvel de *Leishmania* e LPS. CCL2 é uma quimiocina conhecida por desempenhar importante papel na resposta imune contra *Leishmania*, sendo observada que frequência de monócitos expressando CCL2 foi significativamente maior no sangue periférico de pacientes com LC quando comparados aos indivíduos saudáveis, indicando que células expressando CCL2 podem migrar para o sítio da lesão. Análises de biópsias de pacientes com LC mostraram que a população de monócitos predominante encontrada na lesão desses indivíduos são os monócitos não-clássicos. **Conclusão:** A identificação de células que contribuem para a imunopatologia observada na LC pode ajudar para desenvolver novas formas de imunoterapia para essa doença. **Palavras-chave:** leishmaniose, imunopatologia, subpopulações de monócitos.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GERAL

- Caracterizar fenotipicamente e funcionalmente as subpopulações de monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar a frequência das diferentes subpopulações de monócitos no sangue periférico de indivíduos sadios (IS), pacientes com leishmaniose cutânea recente (LCR), leishmaniose cutânea (LCR), com infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.
- 2- Avaliar o grau de ativação das diferentes subpopulações de monócitos no sangue periférico de indivíduos sadios, pacientes com leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea recente, com infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.
- 3- Determinar a frequência das subpopulações de monócitos expressando TNF.
- 4- Avaliar a expressão de CCL2 em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico e em sobrenadante de biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea.

III. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas um complexo de doença com grande importância clínica, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo responsáveis por lesões ulcerativas na pele e mucosas. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o agente causador mais importante da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil (Ministério da Saúde/SVS, 2009) e prevalente em várias localidades do estado da Bahia, além de associada às seguintes formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea com lesão recente (LCR), leishmaniose disseminada (LD) e leishmaniose mucosa (LM). A LCR é a fase inicial da doença que se apresenta em forma de pápula (lesão não ulcerada) ou exulcerativa acompanhada de linfadenopatia evoluindo para leishmaniose cutânea (Barral, Guerreiro et al., 1995; Ribeiro-De-Jesus, Almeida et al., 1998; Bacellar, Lessa et al., 2002) que é a manifestação mais comum da doença, caracterizada por uma lesão ulcerada bem delimitada e bordas elevadas, com grande incidência de linfócitos, macrófagos e monócitos no infiltrado inflamatório (Marsden, 1994a; Follador, Araujo et al., 1999). Um pequeno percentual destes indivíduos representando aproximadamente 3% desenvolvem a LM, com comprometimento da mucosa nasal em quase que a totalidade dos registros (Marsden, 1986; Jones, Johnson et al., 1987; Bacellar, Lessa et al., 2002). A LD é caracterizada pela presença de múltiplas lesões cutâneas acneiformes, papulares e ulceradas com alta produção de citocinas pro-inflamatórias (Bacellar, Lessa et al., 2002).

Pacientes com diferentes manifestações clínicas de LTA, apresentam uma resposta imunológica associada ao perfil Th1/Th2 com produção de citocinas diferentes e contrareguladoras (Bittencourt e Barral, 1991; Morgado, Schubach et al., 2008). Nos indivíduos infectados por *L. braziliensis*, uma forte resposta do tipo Th1 é observada o que contribui para o controle da multiplicação dos parasitos. Entretanto, altos níveis de TNF que são documentados na LC, não são apropriadamente modulados, o que leva a imunopatologia observada nesses pacientes (Ribeiro-De-Jesus, Almeida et al., 1998; Bacellar, Lessa et al., 2002; Da-Cruz, Bittar et al., 2002; Gomes-Silva, De Cassia Bittar et al., 2007). Várias células do sistema imune participam na produção de citocinas e quimiocinas e na expressão de moléculas que auxiliam

na eliminação do parasito. Neste arsenal imunológico, os monócitos têm sido considerados muito importantes como células de primeira linha na defesa contra patógenos, tendo em vista, que estão presentes na circulação sanguínea e são precursores de macrófagos em resposta a inflamação tecidual (Van Furth e Cohn, 1968). Nos últimos anos, grande ênfase tem sido dada ao papel dos monócitos na patogênese de várias doenças inflamatórias (Ziegler-Heitbrock, 2000; Ancuta, Rao et al., 2003). No princípio dos anos 80, Passlick (1989) identificou uma pequena população dos monócitos que expressavam CD14 e eram CD16 (FcγRIII) positivos. Estas células foram denominadas pró-inflamatórias, devido ao aumento da expressão de MHC II (Complexo de histocompatibilidade principal) e a diminuição da capacidade de fagocitose, além de produzirem grandes quantidades de TNF, e baixos níveis de IL-10 (Belge, Dayyani et al., 2002).

Recentemente nova abordagem tem sido dada a classificação dos monócitos de acordo a expressão da molécula CD16⁺ na superfície de (Zeigler-Heitbrock, Ancuta., 2010). Assim, os monócitos foram classificados em três subpopulações, sendo monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), monócitos intermediários (CD14⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺). Baseado em estudos que avaliam o papel dos monócitos na patogênese de doenças inflamatórias, o objetivo deste trabalho foi determinar a frequência destas subpopulações no sangue periférico de indivíduos saudáveis, pacientes com LCR e LC, avaliar o estado de ativação dessas células, e sua capacidade em contribuir para resposta inflamatória na leishmaniose cutânea.

IV. REFERENCIAL TEÓRICO

IV.1 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

As leishmanioses compreendem um grupo de patologias causadas por diversas espécies de protozoários que se agrupam à ordem *Kinetoplastida*, pertencentes à família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (Grimaldi, Tesh et al., 1989), sendo considerada uma doença negligenciada por vários países da Europa, África, Ásia e América (Desjeux, 1996; 2004b) e continua sendo um problema de saúde pública no Brasil e no mundo (Ministério da Saúde/SVS, 2009). Diante da importância clínica, as leishmanioses são listadas como uma das seis mais importantes doenças infecto-parasitárias pela Organização Mundial de Saúde, estando continuamente em franca expansão. A leishmaniose se apresenta sob duas formas: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). Essas formas distintas da leishmaniose abrangem 88 países dos cinco continentes onde 13 destes países possuem condições precárias de vida (Desjeux, 2004b). A leishmaniose visceral ocorre em 65 países e 90% dos casos relatados englobam área de extrema pobreza (Desjeux, 1996; Lindoso e Lindoso, 2009) e a maioria das ocorrências de LTA compreende os seguintes países: Afeganistão, Algéria, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (Desjeux, 1996).

A leishmaniose se manifesta nas faixas tropicais e subtropicais do globo, exceto Austrália e Nova Zelândia e algumas ilhas do pacífico, preferencialmente nas zonas rurais e áreas de subúrbios destes países (Desjeux, 1996). Segundo o Ministério da Saúde (2009), estima-se que estão expostos ao risco de infecção 350 milhões de pessoas sendo 2 milhões de novos casos por ano das diferentes manifestações clínicas com prevalência global de 12 milhões e cerca de 1,5 milhões de notificações anuais (Ministério da Saúde/SVS, 2009). Adicionalmente, o descaso na notificação de casos e a subestimação da incidência agregam um aumento no risco de infecção onde não se conhece o comportamento real da doença (Alvar, Yactayo et al., 2006). Apesar de doença ser conhecida há muito tempo, vários fatores têm despertado o interesse no tratamento da leishmaniose e seus vetores (Alvar, Croft et al., 2006). A falta de

uma assistência terapêutica eficaz associada aos custos e efeitos adversos serve para enfatizar a importância do controle de vetores na prevenção da doença.

O número de casos da LTA no Brasil continua a aumentar desde a década de 80, com mudanças no perfil epidemiológico. Atualmente tem sido documentada em praticamente todos os estados, sendo considerada uma doença reemergente em forte expansão. A doença não se encontra mais reservada às regiões florestais ocorrendo nos grandes centros, destacando-se a região Norte, Centro Oeste e Nordeste. As dificuldades no fornecimento de estimativas reais de pessoas infectadas pela *L.braziliensis*, devido à falta de diagnósticos adequados e a imprecisão dos relatos de notificações (Desjeux, 2004b), camuflam os problemas existentes e levam a falta de promoção dos serviços necessários a essa população.

No nordeste brasileiro, o Maranhão apresenta os maiores coeficientes de detecção de casos de LTA seguidos do Ceará e Bahia (Ministério da Saúde/SVS, 2009). Na Bahia observa-se ampla dispersão e a transmissão ocorre principalmente na área rural sendo endêmica em praticamente todo estado, com surtos epidêmicos registrados em vários municípios. Segundo a Secretaria de vigilância em Saúde (2009), a Bahia apresenta grande número de casos notificados e compreende várias localidades, dentre elas, a região de Três Braços e Corte de Pedra. Em Corte de Pedra, região do nosso estudo, é uma área endêmica para leishmaniose. Estudos epidemiológicos, clínicos e imunológicos têm sido realizados a mais de 20 anos, em Corte de Pedra, registrando as maiores taxas de incidência no estado, sendo que foram registrados 819 casos de leishmaniose cutânea em 2006 e 867 em 2011. Os casos de leishmaniose mucosa entre os anos de 2006 e 2011 foram representados por 32 e 13, respectivamente.

IV.2 Transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A leishmaniose é uma doença causada por vetores (flebotomíneos), sendo sua transmissão através da picada destes insetos hematófagos que buscam alimento durante a maturação dos ovos. Os flebótomos são parasitados por protozoários intracelulares obrigatórios e a sua infecção é efetiva quando duas fases principais de seu ciclo de vida se completam: amastigotas intracelulares no hospedeiro mamífero e promastigotas móveis no vetor flebótomo. A doença se inicia quando o flebótomo fêmea do gênero *Lutzomya* inocula o protozoário através da picada durante o repasto sanguíneo no hospedeiro humano ou em outro mamífero (desjeux, 2004a). As promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e células de langherhans onde se replicam e se multiplicam em amastigotas, considerada a forma infectante (Nieves e Pimenta, 2000). Seguindo este processo o ciclo de infecção se reinicia a cada repasto sanguíneo. Após a inoculação dos parasitos diferentes células da resposta imune inata respondem em defesa contra este protozoário, incluindo neutrófilo, monócitos, macrófagos e células dendríticas (Barral, Pedral-Sampaio et al., 1991; Bacellar, Lessa et al., 2002).

IV.3 Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

A espécie *Leishmania (viannia) braziliensis* é prevalente na região de Corte de Pedra causando as seguintes formas clínicas: leishmaniose cutânea recente (LCR), leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD) (Grimaldi e Tesh, 1993; Carvalho, Barral et al., 1994). O diagnóstico para determinação destas formas clínicas é baseado na anamnese bem detalhada do paciente quanto aos aspectos clínicos, epidemiológicos, exame físico adequado seguido de testes laboratoriais com teste de hipersensibilidade tardia, apresentando uma pápula de 5mm ou mais de diâmetro (Jirmanus, Glesby et al., 2012; Machado, Araujo et al., 2002).

A leishmaniose cutânea recente (LCR) é a fase inicial, pré-ulcerativa da leishmaniose cutânea, que se estabelece no local da picada do flebótomo durante o início da infecção, ocorre formação de pápula ou nódulo seguido de

ulceração superficial acompanhada da reação positiva ao antígeno de *Leishmania* com presença de linfadenopatia ou não (Barral, Guerreiro et al., 1995). Leucócitos e células mononucleares interagem com a *Leishmania* e inicia uma resposta imunológica com produção de citocinas inflamatórias com ações diversificadas, nestes eventos recentes da LC pode-se encontrar um número mais elevado de parasitas no local da lesão (Boaventura, Café et al., 2006). Como o sistema imune não consegue eliminar todos os parasitos termina por causar uma reação inflamatória muito intensa e a pápula evolui para a formação de uma úlcera, sendo classificada como leishmaniose cutânea.

A leishmaniose cutânea (LC) se caracteriza pela presença do DTH⁺ (teste de hipersensibilidade tardia) associado a uma lesão ulcerativa, evidências de infecção através da cultura do parasito do aspirado de lesão ou histopatologia compatível com LC. É a forma mais comum da doença representando 90 a 95% dos casos da LTA e se manifesta com ulceração cutânea única, bordas elevadas granulomatosa, geralmente autolimitada, podendo ocorrer cura espontânea (Bittencourt e Barral, 1991). Nas regiões de transmissão, geralmente são afetados os locais expostos do corpo de adultos do gênero masculino devido à exposição de atividades rurais. Entretanto, clinicamente há situações de duas ou mais lesões ativas presentes nestes pacientes. Foi observado que na LC encontram-se poucos parasitos ou quase nenhum na lesão (Bittencourt e Barral, 1991) e baixa sensibilidade a testes sorológicos (Machado, Rosa et al., 2011). Nesta situação a intradermo reação de Montenegro positiva (IDRM+), úlcera típica e achados histopatológicos compatíveis podem ser usados como diagnóstico para identificar a LC. Aproximadamente 3% dos indivíduos portadores da LC em consequência da sobrevivência de alguns parasitos na pele depois da reepitalização podem levar ao desenvolvimento da forma mucosa (Jones, Johnson et al., 1987; Marsden, 1994b; Bacellar, Lessa et al., 2002).

A leishmaniose mucosa (LM) se desenvolve como uma complicação da leishmaniose cutânea e apresenta várias lesões cutâneas múltiplas de desenvolvimento lento e progressivo, compromete a região mucosa e submucosa, principalmente o nariz, boca e orofaringe, constitui um sério problema, não só pelas deformidades que pode causar, como também pela

dificuldade terapêutica, sendo causada principalmente por *L. (Viannia) braziliensis* (Jones, Johnson et al., 1987; Marsden, 1994a). A disseminação dos parasitas ocorre através da via linfática para colonizar o trato das mucosas, e o surgimento das lesões geralmente ocorre meses ou anos após a involução das lesões da pele ou induzida por tratamento. (Marsden, 1986; Jones, Johnson et al., 1987).

Do ponto de vista clínico, Carvalho et al (1994) publicaram que a leishmaniose cutânea disseminada (LD) distingue-se por apresentar lesões papulosas e acneiformes com um número reduzido de úlceras, localizadas na face, tronco e membros. Após a formação da lesão primária, parasitos são disseminados pelo sangue ou via linfática, estabelecendo uma infecção que o tempo de incubação ocorre por 24 horas, o que pode justificar as lesões distantes do local da picada. Além disso, os números de lesões papulares podem variar em menor que dez a centenas, espalhadas pelo corpo. Doença rara observada aproximadamente em 2% dos indivíduos acometidos pela LTA, sendo espécies *L. braziliensis* e a *L. amazonensis* as mais envolvidas no seu desenvolvimento (Turetz, Machado et al., 2002).

IV.4 Aspectos imunológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

O controle da *Leishmania* é dependente da espécie envolvida na infecção, dos fatores genéticos do parasito e do hospedeiro e da imunidade contra antígenos parasitários (Schriefer, Schriefer et al., 2004). Essa imunidade é mediada por células (macrófagos, células dendríticas, natural killer (NK), linfócitos (T CD4⁺ e T CD8⁺)) e por citocinas (IFN- γ , IL-12) e moléculas efetoras presentes na resposta imune inata e adaptativa. Tanto em humanos como em modelo experimental a infecção é controlada predominantemente por linfócitos T (Alexander e Bryson, 2005) sendo as células T CD4⁺ a principal produtora de IFN- γ em células mononucleares do sangue periférico e na lesão (Carvalho, Johnson et al., 1985; Pirmez, Yamamura et al., 1993). As células T CD8⁺ também participam na produção dessa citocina (Antonelli, Dutra et al., 2004) e os macrófagos ativados são os responsáveis pela eliminação dos parasitos

(Carvalho, Johnson *et al.*, 1985; Scott, Pearce *et al.*, 1989). No entanto, uma das atividades da *Leishmania* quando fagocitada por macrófagos é a inibição da produção de interleucina 12 (IL-12) bloqueando o desenvolvimento da resposta imune Th1 (Shweash, Adrienne Mcgachy *et al.*, 2011).

Nos indivíduos infectados por *L. braziliensis* há produção de altos níveis de IFN- γ , TNF e baixa produção de IL-5 e IL-10. Essas citocinas contribuem para o recrutamento de várias células para a infecção, sendo os neutrófilos as primeiras células a chegarem ao local da infecção e juntamente com um significativo aumento da expressão de quimiocinas CCL2, CXCL9 e CXCL8 (Giudice, Vendrame *et al.*, 2012), substâncias quimioatraentes de monócitos, macrófagos e linfócitos. A importância das células T CD4⁺ no desempenho e no desfecho da leishmaniose tegumentar tem sido estudada tanto em modelos murinos quanto em humanos, o estudo do perfil destas células pode estabelecer o paradigma de resistência e susceptibilidade para infecção intracelular mediada pela resposta Th1 e Th2 respectivamente (Mosmann, Cherwinski *et al.*, 1986; Liew, 2002).

A resposta imunológica dos pacientes com LC é acompanhada por teste de Montenegro positivo e uma acentuada resposta de linfócitos ao antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) produzindo grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (Carvalho, Johnson *et al.*, 1985). Essa produção de citocinas pró-inflamatórias, proliferação de linfócitos, ativação de monócitos e macrófagos caracteriza a resposta imune tipo Th1. Essa resposta exerce um papel fundamental no controle da infecção causada pela *Leishmania*, através da produção de IFN- γ e TNF, e consequente ativação do macrófago e produção de óxido nítrico e produtos oxigenados, moléculas capazes de controlar a multiplicação dos parasitos (Giudice, Vendrame *et al.*, 2012; Scott, Natovitz *et al.*, 1988; Green, Scheller *et al.*, 1994).

Em estudo experimental com camundongos (C57BL/6) resistentes à infecção, a presença de neutrófilos representam 60% do infiltrado celular após a inoculação com diminuição da carga parasitária (Sacks e Noben-Trauth, 2002), sendo substituídos preferencialmente por monócitos após três dias de infecção. Os monócitos e células dendríticas recrutados pela produção dessas citocinas e

quimiocinas são componentes importantes no percurso da resposta imune inata à adaptativa (Geissmann, Auffray *et al.*, 2008). O contato com amastigotas por essas células resulta na apresentação de antígeno, preferencialmente, através da molécula de MHC II que ativam linfócitos T CD4⁺ (Sacks e Noben-Trauth, 2002). Assim, foi demonstrado que camundongos resistentes C57BL/6 a *Leishmania* estava associada à produção de citocinas IL-12, IFN- γ e TNF e camundongos susceptíveis à infecção se relaciona a produção de IL-4 e IL-13 (Mosmann, Cherwinski *et al.*, 1986; Scott, Pearce *et al.*, 1989). Entretanto, o paradoxo Th1/Th2 apresentada pelo perfil de citocina tem sido discutida, visto que, existe evidência de que a susceptibilidade a infecção pode ser independente de IL-4 (Sacks e Noben-Trauth, 2002). Este paradigma de diferenciação de células T helper foi ampliado com a caracterização de mais uma população de células T efetora produtora da citocina IL-17- as células Th17 possuem funções distintas das células Th1 e Th2. A IL-17 tem desempenhado um papel inflamatório em indivíduos infectados por *L.braziliensis*, sendo encontrada uma produção elevada dessa citocina em pacientes com leishmaniose cutânea quando comparados com controles não infectados LC (Bacellar, Faria *et al.*, 2009).

Nos últimos 10 anos, grande ênfase tem sido dada ao papel das células T na proteção e na resposta inflamatória associada à infecção da LC por *L. braziliensis*. Entretanto, pouco se sabe com relação ao papel dos monócitos, macrófagos e células dendríticas na patogênese da LC. Sabe-se que eles têm a capacidade de destruir a *Leishmania*, e, juntamente com as células dendríticas, são as principais células apresentadoras de antígeno. Os monócitos e macrófagos têm ainda um papel fundamental na ativação de células T e secretam citocinas pró-inflamatórias.

Em humanos, a maior evidência de resistência ao parasito está relacionada com a presença de IFN- γ e TNF (Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998) e a diminuição dessas citocinas na fase inicial da LC se relaciona com aumento da carga parasitária. IFN- γ é importante para o controle da infecção, no entanto, em sinergia com TNF, também está relacionada com a formação da úlcera característica na leishmaniose cutânea (Da-Cruz, De Oliveira *et al.*, 1996; Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998; Bacellar, Lessa *et al.*, 2002; Gomes-

Silva, De Cassia Bittar *et al.*, 2007). Os altos níveis de IFN- γ documentados na LC estimula a síntese de TNF e de iNOS, moléculas que também estão presentes na lesão (Scott, Natovitz *et al.*, 1988).

TNF é uma importante citocina derivada de leucócitos e que está relacionada a processos inflamatórios, portanto, citocina com papel importante na leishmaniose. O TNF participa da lesão tecidual observada nos pacientes com leishmaniose cutânea desde a fase inicial por induzir o aumento da expressão de MHC II e moléculas de adesão de monócitos e macrófagos, sendo os monócitos e macrófagos e células T as principais fontes de TNF.

Estudos demonstram a associação de TNF tanto no controle quanto na multiplicação do parasita desde a primeira fase da infecção, assim como sua participação em mediar a formação da úlcera observada na LC cutânea (Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998; Bacellar, Lessa *et al.*, 2002; Gaze, Dutra *et al.*, 2006). Na úlcera há ausência ou pouca frequência de parasitos (Bittencourt e Barral, 1991), o que demonstra que os parasitos também participam no desenvolvimento da lesão. Foi demonstrado que pacientes com lesões crônicas mostram fortes expressão de citocinas pro-inflamatórias como TNF (Melby, Andrade-Narvaez *et al.*, 1994), e os altos níveis de TNF podem de fato levar à participação destas citocinas no dano tecidual observado na leishmaniose tegumentar, principalmente na LC e na LM (Castes, Trujillo *et al.*, 1993; Da-Cruz, De Oliveira *et al.*, 1996).

A alta produção de IL10 a partir de linfócitos antígeno- específico foi correlacionada com a baixa frequência de monócitos produzindo TNF, demonstrando a atividade reguladora da IL-10 na ativação de monócitos (Antonelli, Dutra *et al.*, 2004). Enquanto há uma correlação positiva entre IL-10 e TNF na LC, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LM secretam altos níveis de TNF e baixa expressão de receptores para IL-10 (Faria, Gollob *et al.*, 2005) podendo levar a uma resposta inflamatória exacerbada na LM.

Evidências apontam que a resposta inflamatória exacerbada na LC é responsável pela formação da úlcera e pelo aparecimento das formas mais graves da leishmaniose. TNF e IFN- γ são produzidos em grandes quantidades

em sobrenadantes de CMSP e na lesão de pacientes com LC e LM (Carvalho, Johnson *et al.*, 1985; Bacellar, Lessa *et al.*, 2002; Faria, Gollob *et al.* 2005), no entanto, não controlam a infecção e desenvolvem úlceras cutâneas e mucosas. Após o tratamento os níveis destas citocinas diminuem (Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998), entretanto, o uso de antimônio na fase inicial da doença não previne o aparecimento da úlcera, estando associado a uma maior falha terapêutica (Machado, Araujo *et al.*, 2002; Unger, O'neal *et al.*, 2009).

Oliveira *et al.* (2011) mostrou uma correlação positiva entre o tamanho da úlcera na primeira avaliação, sua cicatrização e os níveis de TNF, sugerindo que os inibidores que modulam a produção de TNF associados ao tratamento padrão, são mais eficazes para o tempo de cura da lesão destes pacientes. A associação do controle da doença pelo inibidor de TNF também é mostrado em pacientes LM refratários ao uso de antimonial pentavalente (Lessa, Machado *et al.*, 2001).

IV. 5 Características das subpopulações de monócitos e sua participação nas doenças inflamatórias

Os monócitos são fagócitos mononucleares originados a partir de precursores da medula óssea que permanecem no sangue por um curto período de tempo antes de migrarem para o tecido e se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas (Zawada, Rogacev *et al.*, 2011; Iwasaki e Akashi, 2007). Os monócitos são as principais células presentes na imunidade inata contra patógenos intracelulares seguidas de células dendríticas, neutrófilos e através da apresentação de antígenos e secreção de citocinas e quimiocinas ligam a resposta imune inata à adaptativa. Os monócitos conferem características peculiares quanto à produção de citocinas, quimiocinas e expressão de moléculas de ativação celular frente à invasão de agentes patogênicos (Geissmann, Jung *et al.*, 2003; Serbina, Jia *et al.*, 2008). Conferindo uma das suas principais funções de servir como um reservatório para renovação de macrófagos teciduais e células dendríticas apresentadoras de antígenos (Serbina e Pamer, 2006).

Os monócitos têm sido estudados por vários anos e a existência de diferentes subpopulações dentro da linhagem monocítica tem sido considerada como importantes células efetoras imunitárias. Os monócitos representam cerca de 10% dos leucócitos circulantes (Auffray, Sieweke *et al.*, 2009). Na década de 80 os monócitos humanos foram classificados em duas subpopulações de acordo a expressão dos receptores Fc γ RII (*Fc gamma receptors II*), que é o receptor do lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram negativas de alta afinidade para a imunoglobulina G (Fc γ RII-CD14), e do Fc γ RIII (*Fc gamma receptors III*) de baixa afinidade para imunoglobulina G (Fc γ RIII-CD16), estando, portanto, associados à inflamação, sendo identificadas em monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) e inflamatórios (CD14⁺CD16⁺), respectivamente (Passlick, Flieger *et al.*, 1989). Estes receptores são importantes para induzir fagocitose de patógenos opsonizados.

Recentemente, uma nova classificação para as subpopulações foi proposta baseada em marcadores de superfícies de monócitos circulantes não ativados, desde quando em ambientes inflamatórios, as células são mais susceptíveis a mudança de fenótipo e marcadores de superfície (Zeigler-Heitbrock, Ancuta *et al.*, 2010).

A classificação foi caracterizada a partir da diferenciação das células CD16⁺ como clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺), e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺). Zawada *et al.* (2011) reforça a identificação dos monócitos sugerida por Zeigler-Heitbrock ao elaborar um banco de dados de expressão gênica destas subpopulações, descrevendo os genes envolvidos na função fenotípica e a estreita relação entre essas células.

Atualmente, essa é a nomenclatura utilizada, e tem-se identificado estas subpopulações celulares associadas a anticorpos de fluorescência por citometria de fluxo (Tallone, Turconi *et al.*, 2011; Zeigler-Heitbrock, Ancuta *et al.*, 2010) que permite através de alta sensibilidade diferenciar estas células também por características morfológicas como tamanho e granulosidade. Estudos têm relatado a participação dessas diferentes subpopulações de monócitos nas doenças inflamatórias, referindo a alterações na expressão das

moléculas CD14⁺ e CD16⁺ durante o desenvolvimento da patologia. Estas subpopulações apresentam diferenças em suas funções, propriedades migratórias, expressão de moléculas de superfície e produção de citocinas.

Os monócitos clássicos estão presentes em maiores quantidades no sangue periférico representando em indivíduos sadios cerca de 80 a 95% (Aguilar-Ruiz, Torres-Aguilar *et al.*, 2011; Strauss-Ayali, Conrad *et al.*, 2007). Estes monócitos apresentam o perfil CD14⁺⁺CD16⁻ (Zawada, Rogacev *et al.*, 2011; Zeigler-Heitbrock, Ancuta *et al.*, 2010) e possuem alta afinidade ao receptor de lipopolissacarídeo que se liga ao FcRII-CD14. Estas células matam eficientemente parasitas intracelulares, haja vista, que a sua capacidade fagocítica e citotoxicidade são bastante acentuadas (Cros, Cagnard *et al.*, 2010) expressam mais CCR2 em relação às outras subpopulações (Zhao, Zhang *et al.*, 2009) e possuem menor frequência de MHC II quando comparados aos monócitos intermediários, no entanto são bons ativadores para as células T CD4⁺ (Aguilar-Ruiz, Torres-Aguilar *et al.*, 2011; Zawada, Rogacev *et al.*, 2011). *In vitro*, quando estimulados com LPS observa-se aumento na produção de IL-10 em relação à TNF e IL-1.

Os monócitos intermediários são identificados por expressarem CD14⁺ CD16 FcγRIII-positivos (CD14⁺⁺CD16⁺). Esses monócitos possuem um estágio maior de diferenciação celular, estando relacionados a mudanças de fenótipos para células dendríticas ou macrófagos (Ancuta, Liu *et al.*, 2009), e apresentam genes relacionados ao processamento e apresentação de antígenos (Ancuta, Liu *et al.*, 2009) e relativa atividade fagocítica (Zawada, Rogacev *et al.*, 2011). Muitos estudos mostram a importância clínica dos monócitos CD16⁺, estas células estão mais ativadas em processos inflamatórios e infecciosos (Tallone, Turconi *et al.*, 2011; Thieblemont, Weiss *et al.*, 1995; Tatayama, Matsubara *et al.*, 2000) e expressam potencialmente receptores de quimiocinas CCR5, CCR2 e CX₃CR1 em diferentes estágios da cirrose hepática (Zimmermann, Seidler *et al.*, 2010). Essas quimiocinas têm sido implicadas em patologias como artrite reumatoide, aterosclerose e infecção por HIV (revisado por Zeigler-Heitbrock, 2007) pelo recrutamento desses monócitos. Também foi revisto recentemente na malária (Chimma, Roussilhon *et al.*, 2009) As implicações da produção de

quimiocinas tem demonstrado ser um fator importante na regulação de respostas inflamatórias.

Os monócitos não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) representam aproximadamente 5 a 10% dos monócitos circulantes (Gordon e Taylor, 2005). Este fenótipo possui fraca expressão para outros receptores Fc, como Fc γ RI e Fc γ RII (Strauss-Ayali, Conrad *et al.*, 2007). Expressam genes relacionados à MHC II e possui alta capacidade de diferenciação fenotípica (Zawada, Rogacev *et al.*, 2011; Zeigler-Heitbrock, 2007). Esses monócitos são providos de grande motilidade e atividade promotora para divisão celular. Entre as três subpopulações, estas células estão mais inseridas na sinalização e migração de leucócitos para os tecidos (Zawada, Rogacev *et al.*, 2011). Outra característica destes monócitos é a diminuição da fagocitose (Frankenberger, Sternsdorf *et al.*, 1996; Auffray, Sieweke *et al.*, 2009). Esta subpopulação foi classificada como uma menor frequência de monócitos que expressam mais Fc γ RIII associados com recrutamento de moléculas de adesão, receptores de quimiocinas (CX3CR1) (Ancuta, Rao *et al.*, 2003) em condições inflamatórias (Aguilar-Ruiz, Torres-Aguilar *et al.*, 2011), sendo portanto consideradas células mais maduras por expressarem mais CD16⁺ que os monócitos CD14⁺⁺.

A produção de quimiocinas/citocinas e expressão de moléculas co-estimulatórias pelas subpopulações de monócitos, resulta no recrutamento de outras células para o local da infecção (Aguilar-Ruiz, Torres-Aguilar *et al.*, 2011; Ancuta, Rao *et al.*, 2003; Zeigler-Heitbrock, 2007), fato que atribui a estas células o papel de estimuladoras críticas nas doenças inflamatórias. Os monócitos, em particular, tem a capacidade de migrarem e diferenciar seu imunofenótipo direcionando um perfil para agravo ou cura durante o curso da patologia (Zawada, Rogacev *et al.*, 2011).

Nas doenças inflamatórias a participação dos monócitos foi descrita em estudos publicados sobre doença crônica cardiovascular infantil indicando um significativo aumento na expressão dos receptores de quimiocinas CCR5, CX₃CR1 relacionados ao perfil dos monócitos inflamatórios (CD14⁺⁺ CD16⁺, CD14⁺CD16⁺⁺) (Rogacev, Seiler *et al.*, 2010). Os monócitos CD16⁺ são

expandidos na fase aguda da doença inflamatória de Kawasaki (Katayama, Matsubara *et al.*, 2000), , assim como foi identificado um aumento pronunciado da frequência destes monócitos com elevada expressão de CCR5 e CCR1 acentuando a participação do infiltrado das subpopulações na progressão da artrite reumatóide.

Os monócitos CD16⁺ produzem altos níveis de TNF induzida por LPS (Cros, Cognard *et al.*, 2010) via receptor Toll-like (TLR4 e TLR2) (Belge, Dayyani *et al.*, 2002; Landsaman, Bar-On *et al.*, 2009).

IV. 6 Participação dos monócitos e macrófagos na Leishmaniose

Na defesa contra a *Leishmania*, os monócitos e macrófagos desempenham um papel importante na fagocitose de promastigotas, visto que, todas as espécies de *Leishmania* parasitam o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro. Como primeira resposta ao contato com o protozoário, estas células estimulam a produção de IL-12 (Gorak, Engwerda *et al.*, 1998) e indução de INF- γ e TNF por células Th1, necessário para a atividade efetora dos monócitos e macrófagos (Belkaid, Butcher *et al.*, 1998; D'oliveira, Machado *et al.*, 2002). A ação de IFN- γ e TNF aumenta a atividade produzida dos macrófagos infectados, induzindo potencial leishmanicida por estimular a síntese de iNOS (síntese induzível de óxido nítrico) e reativos de oxigênio, moléculas tóxicas capazes de eliminar o parasita (Liew, Parkinson *et al.*, 1990; Nathan e Hibbs, 1991).

No início da infecção de macrófagos por *L. braziliensis* é estabelecida uma forte resposta inflamatória no local da picada (Carvalho, Johnson *et al.*, 1985), um aumento significativo de óxido nítrico, em resposta a fagocitose com diminuição da carga parasitária. Para eliminação da *L. braziliensis*, monócitos e macrófagos ativados utilizam mecanismos associados à TNF e dependentes da cooperação de outras células (Gately, Renzetti *et al.*, 1998). Monócitos apresentam subpopulações distintas com fenótipos e funções diferentes durante a inflamação (Wong, Tai *et al.*, 2011; Zawada, Rogacev *et al.*, 2011; Zeigler-Heitbrock, 2007).

Portanto, investigar as contribuições das subpopulações de monócitos no processo inflamatório na infecção por *L.braziliensis* se tornou o objetivo principal deste estudo.

V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.

V. 1 Área endêmica em leishmaniose

Corte de Pedra é um vilarejo do município de Presidente Tancredo Neves, localizado no Sudeste do estado da Bahia, um vilarejo distante 280 km de Salvador, capital da Bahia. Esta área endêmica em leishmaniose tem abrangência muito além deste vilarejo, onde se localiza o posto de saúde que atende uma população de aproximadamente 10 municípios. Este posto de saúde foi criado no ano de 1980 e, desde então, tornou-se centro de referência no diagnóstico e tratamento para leishmaniose tegumentar abrangendo a população de 14 municípios circunvizinhos (Jirmanus et al., 2012). Médicos vinculados ao Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES) da Universidade Federal da Bahia visitam esta região e dão assistência aos indivíduos acometidos pela leishmaniose. O vilarejo também recebe apoio de agentes de saúde, residentes na vila, que são treinados para visitar famílias e recrutar pacientes para realização de pesquisas e acompanhamento clínico.

O grupo de pesquisadores do Serviço de Imunologia, incluindo médicos clínicos, imunologistas, dermatologistas e infectologistas além de uma equipe de pesquisadores, biólogos e farmacêuticos viajam quinzenalmente de Salvador até Corte de Pedra para prestar atendimento aos pacientes. Durante estas visitas são selecionados os candidatos que participarão dos projetos de pesquisas nos últimos 20 anos este grupo vem estudando os aspectos clínicos e imunológicos da leishmaniose tegumentar no Posto de Saúde de Corte de Pedra.



Localização do Município de Corte de Pedra **Fonte:** Wikipédia



Centro de referência em Leishmaniose Dr. Jackson M.L.Costa - Corte de Pedra - BA

V.2 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de Corte Transversal de uma população endêmica em leishmaniose, que foi avaliada quanto à frequência e ativação das diferentes subpopulações de monócitos no sangue periférico. O total de 45 pacientes incluídos no estudo, sendo 15 com diagnóstico de LCR, 15

diagnosticados com LC e 15 indivíduos sadios não-residentes na área endêmica. Todos os pacientes foram avaliados antes do início do tratamento.

V.3 DEFINIÇÕES DE CASOS

V.3.1 Leishmaniose Cutânea Recente (LCR)

Os pacientes caracterizados com linfadenopatia ou linfadenopatia acompanhada de pápula ou lesão exoulceraiva e presença de infiltrado inflamatório. O diagnóstico é realizado pela identificação do parasita através da punção do linfonodo, biópsia de lesão ou quadro típico de leishmaniose cutânea recente acompanhada do teste de hipersensibilidade tardio positivo ao antígeno solúvel de *leishmania*.

V.3.2. Leishmaniose Cutânea (LC)

Pacientes com esta forma clínica foram definidos pela presença de lesão ulcerativa na pele, sem comprometimento da mucosa nasal. O diagnóstico é feito pela identificação do parasita através da cultura do aspirado de lesão, ou pelo achado da lesão típica da LC associado ao teste de hipersensibilidade tardio positivo ao antígeno solúvel de *leishmania* e histopatologia compatível com Leishmaniose Tegumentar.

V.3.3. Indivíduos Sadios (IS)

Os indivíduos sadios são definidos como indivíduos não-residentes na área endêmica de Corte de Pedra sem apresentarem diagnóstico para outras doenças infecciosas.

V.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Indivíduos de qualquer gênero, com idade superior a 15 anos e inferior a 60, residentes na área endêmica que apresentaram diagnóstico para leishmaniose baseado nos critérios das definições de casos descritos acima.

Para o grupo controle foram incluídos indivíduos saudáveis de ambos os gêneros, com idade superior de 15 anos e inferior a 60, não residentes na área endêmica e sem história prévia de leishmaniose.

V.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão para este estudo foram pacientes que apresentaram ou apresentarem história pregressa da doença ou outras doenças infecciosas e imunossupressoras.

V.6. METODOLOGIA

V.6.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) para cultura.

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas a partir de amostra de 20mL de sangue heparinizado de indivíduos saudáveis e pacientes com LC e LCR, diluído 1:2 em solução salina a 0.9%, e separadas por gradiente de densidade, o Ficoll-Hipaque™ Plus (GE healthcare, Biosciences AB Durham, NC, USA). As células mononucleares foram coletadas por aspiração, lavadas por três vezes com solução salina a 0.9% a 1290rpm por 10 minutos. As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas a uma concentração de 1×10^6 para cultura e $0,5 \times 10^6$ para FACS. As células destinadas a cultura foram resuspensas em 1mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), (RPMI 1640, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA, SFB 12657 Gibco Laboratories, invitrogen™ América do Sul), 10 IU/mL de penicilina e 100µg/mL de streptomina, divididas em tubos para Citometria de fluxo (FACS). Estas células foram deixadas em cultura durante 8 horas estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS 10µg/mL) e sem estímulo. As células foram marcadas com APC (anti-CD14 BD Pharmingen™) e feito uma análise da produção intracelular de citocina TNF. Para controle destes experimentos marcados com isotipo controle foi realizado.

V.6.2 Marcação superfície celular - ex vivo.

As células contadas e ajustadas na concentração de $0,5 \times 10^6$ células foram colocadas em tubos poliestirenos de 5 mL para marcação celular- FACS (BD Biosciences Falcon™ 352052). A marcação com anticorpos monoclonais APC (anti-CD14 BD Pharmingen™) e PE (anti-CD16 BD Pharmingen™) foi usada para avaliar a frequência das subpopulações de monócitos no sangue periférico dos pacientes com LC, LCR e de indivíduos saudáveis. Foi também usado o anticorpo monoclonal FITC (anti-HLA-DR eBioscience) para avaliar a expressão das moléculas de ativação celular destes pacientes. Este anticorpo foi diluído na concentração de 1:10. Em seguida lavadas e fixadas com paraformaldeído a 2%. Estas células foram analisadas por Citometria de Fluxo, inicialmente considerando os parâmetros de tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) para a delimitação da região dos monócitos.

V.6.3 Preparação das biópsias para marcação de superfície.

Foram coletadas 6 biópsias do bordo da lesão de pacientes com leishmaniose cutânea, em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), (RPMI 1640, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA, SFB 12657 Gibco Laboratories, invitrogen™ América do Sul), maceradas e tratadas com liberase e postas por uma hora na estufa a 37°C a 5% de CO₂. Liberase é uma enzima que atua na degradação o colágeno, principal proteína da matriz extracelular, facilitando na extração das células. Após de retiradas da estufa é adicionado 1 mL por tubo do tampão de lise (ACK Lysing Buffer – Lonza) para que ocorra a lise das hemácias. Logo após, as células são lavadas com solução salina a 9%, todas são usadas para a marcação de superfície. Foram utilizados anticorpos monoclonais APC (anti-CD14 BD Pharmingen™) e PE (anti-CD16 BD Pharmingen™), diluídos na concentração de 1:10 com a finalidade de avaliar a frequência das subpopulações de monócitos nas biópsias destes pacientes. A contagem dos eventos foi realizada por Citometria de Fluxo, considerando os parâmetros de tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) para a delimitação da região dos monócitos.

V.6.4 Marcação intracelular.

Foram feitas culturas de células na concentração de 1×10^6 células por tubo, em meio, estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 10ng/mL, infectadas por *Lbb* (*leishmania braziliensis*) na proporção de 5:1, sendo incubadas a 37C° em estufa de CO² a 5% por 1hora. Em seguida foi adicionado Stop Golgi, que tem a função de inibir o transporte de proteínas a partir do retículo endoplasmático para complexo de golgi (protocolo-BD Cytotfix/Cytoperm™Plus Fixation/Permeabilization Kit With BD GolgiPlug™555028) durante as 8 horas finais de culturas na estufa de CO² em 37 C° a 5% de CO₂. Estas células foram centrifugadas e feita marcação de superfície com anticorpo monoclonal APC (anti- CD14 (BD Pharmingen™) e anticorpo monoclonal FITC (CFSE- *Lbb*). As células foram incubadas durante 15', depois lavadas com PBS1X e fixadas com paraformaldeído a 2%. Depois de 24 horas foram lavadas com PBS 1x e ressuspensas em solução BD Perm/Wash durante 15 minutos, novamente centrifugadas por 5' e marcadas com anticorpo monoclonal intracelular PE (anti-TNF- α , protocolo BD Perm/Wash) no período de 30' em 4C°. Essas células foram analisadas usando o FACS Canto II. Para análises dos dados em Citometria de Fluxo, a região de monócitos foi delimitada levando em consideração os parâmetros tamanho (SSC) e granulosidade (FSC).

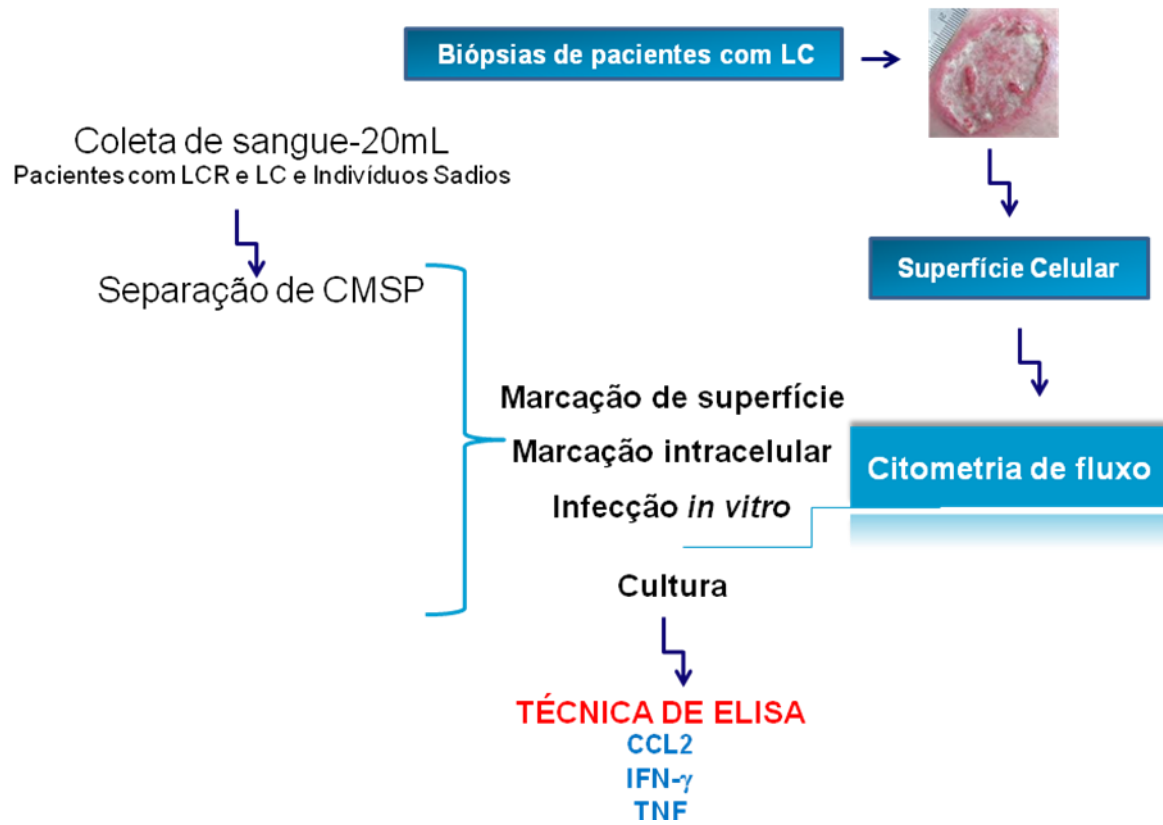
V.6.5 Preparação de *Leishmania* para infecção – cepa 11245 de *L.braziliensis*.

A escolha da cepa para infecção foi realizada através do protocolo de descongelamento e crescimento de *Leishmania*, onde, a cepa de *L. braziliensis*-11245 foi retirada do nitrogênio para descongelamento, sendo transferida para o meio Schneider, contada em câmara de Neubauer ajustada a uma proporção de 5×10^6 parasitos por célula. Para avaliar o melhor ponto infecção desta cepa, 5×10^6 parasitos foram ressuspensos em 5mL de meio Schneider, contados durante sete dias para identificação e melhor desenvolvimento da fase estacionária.

V.6.6 Dosagem de CCL2, IFN- γ e TNF.

Os níveis de CCL2, IFN- γ e TNF foram dosados nos sobrenadantes de cultura de CMSP de indivíduos saudáveis, pacientes com LCR e LC e em sobrenadantes de biópsias de pacientes com LC. Todas as amostras se apresentavam em meio e sob-estímulo de SLA. A dosagem foi realizada através da técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Para dosagem de CCL2, IFN- γ e TNF utilizamos o KIT da BD Biosciences foi utilizado (BD OptEIA™ Set Human MCP-1). A sensibilização das placas foi realizada com 100 μ l de anticorpo de captura diluído em solução diluente (PBS 1x com 10% de soro fetal bovino) deixadas over night, e, após três lavagens com 300 μ l/ poço com solução de lavagem foi adicionado 200 μ l de solução diluente para bloqueio, deixada em temperatura ambiente por de 1 hora para incubação. Depois lavada por mais 3 vezes e acrescido o padrão e as amostras de sobrenadantes durante 2 horas de incubação. Após mais 5 lavagens adicionou 100 μ l da solução working detector em cada poço por 1 hora. Depois da solução de substrato foi adicionada solução stop para revelação. A leitura foi realizada a 450 nm de absorbância.

V.6.7 Fluxograma representativo



V.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados de Citometria de fluxo foram analisados através do software Flowjo (GeneChip® da empresa Affymetrix® versão 7.6.5) e para análise estatística foi utilizado o programa Grafpad prism 5.0 (Grafpad software, San Diego, CA, USA). A distribuição das amostras foi determinada através do teste de normalidade de D'Agostino-Pearson e a escolha dos testes foi de acordo com a distribuição apresentada para cada amostra. Para as amostras com distribuição não-paramétrica, as análises entre grupos de participantes do estudo foram feitas através do teste U de Mann-Whitney, a comparação estatística entre condições diferentes no mesmo indivíduo foi realizada por teste T de Willcoxon. e a comparação entre as três subpopulações de monócitos foi realizada através do teste de Kruskal Wails. Para as amostras com distribuição normal foram utilizados os testes paramétricos equivalentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0.05.

V.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS DA PESQUISA

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e a confidencialidade dos dados foi preservada de acordo com o disposto da resolução 196/96 do CONEP. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, parecer nº 385/2010 sob o protocolo (nº 010/10) e tem financiamento do NIH - Instituto Nacional de Saúde dos EUA. Grant ICIDR AI088650-01.

V.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados de Citometria de fluxo foram analisados através do software Flowjo (GeneChip® da empresa Affymetrix® versão 7.6.5) e para análise estatística foi utilizado o programa Grafpad prism 5.0 (Grafpad software, San Diego, CA, USA). A distribuição das amostras foi determinada através do teste de normalidade de D'Agostino-Pearson e a escolha dos testes foi de acordo com a distribuição apresentada para cada amostra. Para as amostras com distribuição não-paramétrica, as análises entre grupos de participantes do estudo foram feitas através do teste U de Mann-Whitney, a comparação estatística entre condições diferentes no mesmo indivíduo foi realizada por teste T de Willcoxon e a comparação entre as três subpopulações de monócitos foi realizada através do teste de Kruskal Wallis. Para as amostras com distribuição normal foram utilizados os testes paramétricos equivalentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0.05.

V.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS DA PESQUISA

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e a confidencialidade dos dados foi preservada de acordo com o disposto da resolução 196/96 do CONEP. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, parecer nº 385/2010 sob o protocolo (nº 010/10) e tem financiamento do NIH - Instituto Nacional de Saúde dos EUA. Grant ICIDR AI088650-01.

VI. ARTIGO 1

“Intermediate monocyte is the main subset contributing to pathologic immune response during cutaneous leishmaniasis”. Revista The Journal of Immunology (artigo a ser submetido, vide Normas de Publicação em ANEXO V)

Intermediate monocyte is the main subset contributing to pathologic immune response during cutaneous leishmaniasis

Rúbia Costa¹, Lucas P. Carvalho¹, Sara Passos^{1,2}, Taís Menezes¹, Fernanda O. Novais⁴, Andréa Magalhães¹, Luís H. Guimarães¹, David Mosser³, Edgar M. Carvalho^{1,2}, Phillip Scott⁴.

¹Serviço de Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil.

²Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia-Doenças Tropicais (INCT-DT).

³Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland.

⁴Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19103.

*Authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Phillip Scott, 380 South University Avenue room 310B Hill pavilion, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104.

Running title: Monocyte subsets in cutaneous leishmaniasis

Abstract

Ulcer development in cutaneous leishmaniasis (CL) patients is associated with exaggerated inflammatory response with high levels of TNF. Monocytes are known to be important source of TNF during inflammatory processes. While most studies in human leishmaniasis have focused on T cell responses little attention has been given to the contribution of monocytes to immunopathology. Here, we analyzed the frequency and the contribution of monocyte subsets to the inflammatory response observed in patients with CL due to *Leishmania braziliensis* infection. Peripheral blood monocytes in human were recently shown to be heterogeneous according to the CD14 and CD16 expression. We found that early after infection the frequency of CD16⁺ monocytes (intermediate (CD14⁺CD16⁺) and non-classical (CD14^{dim}CD16⁺)) are increased in peripheral blood from CL patients compared to healthy controls. *Ex-vivo* analysis showed that intermediate monocytes expressed significantly more MHC class II than the other monocyte subsets in these patients. Also, when pulsed with soluble *Leishmania* antigen or LPS, intermediate monocytes were the main source of TNF. Circulating classical and intermediate subsets expressed more CCR2, what make us believe that at least one of these two cell subset differentiate into phagocytes with non-classical phenotype at lesion site, once this third population was more prevalent at CL lesions. These data shows that intermediate monocytes are the main inflammatory cell in CL

patients and since this population expresses CD16 it may serve as target in immunotherapy studies.

INTRODUCTION

Leishmania braziliensis infection can cause a wide spectrum of clinical diseases including the most prevalent form, cutaneous leishmaniasis (CL). Upon *L. braziliensis* infection patients with CL initially develop enlargement of the draining lymph node followed by a papule on bite site, which will turn into an ulcer after 1-4 weeks (Barral, Barral-Netto *et al.*, 1992; Barral, Guerreiro *et al.*, 1995). Patients in the pre-ulcerative phase of the disease are considered as having early CL whereas patients with classical ulcerated lesion are called CL [3,4]. In both, pre-ulcerative and ulcerative lesions we and others have found a predominant mononuclear cells infiltrate, composed mainly by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and mononuclear phagocytes (Faria, Gollob *et al.*, 2005). Studies performed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of CL have also shown that macrophages, CD4 and CD8 T cells participate of the exaggerated inflammatory response indicating that systemic immune response reflect what happens at lesion site. Thus, in response to soluble *Leishmania* antigen (SLA), PBMC and monocyte-derived macrophage from CL patients secrete high levels of TNF, a cytokine associated with immunopathology in this disease (Giudice, Vendrame *et al.*, ; Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998; Follador, Araujo *et al.*, 2002; Carvalho, Passos *et al.*, 2007). Evidences for a role for TNF in mediating lesion development in CL include: positive correlation of TNF producing T cells and lesion size (Antonelli, Dutra *et al.*, 2005); high frequency of CD68⁺ cells producing TNF in the lesion site (Faria, Gollob *et al.*, 2005); association of pentoxifylline, a TNF inhibitor, with antimony increases the cure rate, decrease the healing time of CL and cure CL patients refractory to antimony (Lessa, Machado *et al.*, 2001; Machado, Lessa *et al.*, 2007);

Knowledge regarding immunopathogenesis of human leishmaniasis comes mainly from studies showing the participation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in both protection and pathology (Carvalho, Bacellar *et al.*, 1988). However, little attention has been given to the contribution of monocytes to inflammatory response in tegumentary leishmaniasis. Monocytes from peripheral blood migrate to inflammatory sites differentiating into dendritic cells and macrophages, cells that play important role in

antigen presentation and *leishmania* killing, respectively. We have documented that, in presence of SLA or upon *L. braziliensis* *in vitro* infection, macrophages are important source of TNF (Giudice, Vendrame *et al.*, ; Follador, Araujo *et al.*, 2002). It is know that a very low percentage of circulating monocytes (about 10% in healthy individuals) express CD16 (FC γ R III) on cell surface and it has been documented that in some conditions these cells migrate to inflamed sites secreting inflammatory mediators (Ziegler-Heitbrock, Fingerle *et al.*, 1993; Belge, Dayyani *et al.*, 2002). Increased frequencies of these cells have already been documented in blood from patients with inflammatory diseases, as arthritis and sepsis (Fingerle, Pforte *et al.*, 1993; Kawanaka, Yamamura *et al.*, 2002). However, recent studies have described a third population, and based on the expression of CD14 and CD16 these cells can be divided in classical (CD14⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺CD16⁺) and non-classical (CD14^{dim}CD16⁺) monocytes (Zawada, Rogacev *et al.*). Although increased frequency of CD16⁺ cells have been previously documented in patients with CL, the contribution of these cells to immunopathology have not been established in CL (Soares, Barral *et al.*, 2006). Also, with the recent classification splitting CD16⁺ monocytes populations into intermediate and non-classical, it is important to determine what is the role of these cells in either regulating or inducing inflammation during *Leishmania* infection.

In mouse model of *L. major* infection, monocyte migration to infected sites and parasite killing is dependent on CCR2 expression and CCL2, the ligand for this chemokine, is also secreted during human *L. braziliensis* infection (Giudice, Vendrame *et al.*, ; Goncalves, Zhang *et al.*, ; Conrad, Strauss-Ayali *et al.*, 2007). However, in spite of the knowledge that in mouse models CCL2 is the main chemokine recruiting inflammatory monocytes, no studies in human have yet addressed whether what subsets of monocyte is able to respond to it (Goncalves, Zhang *et al.*, ; Willenborg, Lucas *et al.*, ; Conrad, Strauss-Ayali *et al.*, 2007). In the present work we found that the frequency of CD16⁺ monocytes is increased in CL patients even early after infection in the pre-ulcerative phase of the disease and intermediate monocytes are the most activated and the main source of TNF. Moreover, our data show that CCL2 is being produced in CL patients and both classical and intermediate monocytes express CCR2. Interesting in the lesion site there was a predominance of non-classical monocytes.

MATERIAL AND METHODS

Patients.

All early CL and late CL patients were recruited at the health post in Corte de Pedra, Bahia, Brazil, which is a well-known area of *L. braziliensis* transmission. Early CL patients had a papula or papule with small exo-ulcerative lesion, large lymphadenopathy and duration of disease lower than 30 days. Patients with late CL had 1-3 ulcers with raised border and duration of disease ranging from 30 to 70 days. The criteria for diagnosis were parasite isolation or a positive PCR for *L. braziliensis*. Additionally, all patients had in the skin biopsies histological features of CL. In all cases, the immunological analysis was performed before therapy. This research was conducted with the approval of the Ethical Committee of the Hospital Prof. Edgard Santos (Salvador, Bahia, Brazil) and CONEP (Brazil), and informed consent was obtained from each participant.

Antigen and parasite.

SLA was prepared from a *L. braziliensis* isolated from a patient with CL, by sonication, tested for endotoxin using the Limulus amoebocyte lysate test and used at a concentration of 5 µg/ml. *L. braziliensis* was isolated from a patient with CL and maintained in the lab.

Peripheral blood and biopsies assays

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from heparinized venous blood layered over a Ficoll-Hypaque gradient (GE Healthcare), then washed and resuspended in RPMI1640 media. Cells were cultured at 37°C, 5% CO₂ in presence of soluble *Leishmania braziliensis* antigen (SLA, 5 µg/ml) and LPS (5ng/ml), and after 6 or 72 hours cells were stained for flow cytometry as described below or supernatants were collected for cytokine measurement by ELISA (R&D Systems). In some experiments, infection with *L. braziliensis* was done at a ratio of 5 parasites to 1 monocyte for 2 hours. Extracellular parasites were washed and cells were incubated for 4 hours for intracellular TNF detection by flow cytometry. Biopsies were performed using a 4mm punch, treated with Liberase TL (Roche) for 1 hour at 37°C, 5% CO₂, and tissue dissociation were done using cell strainers. Dissociated cells were stained for flow

cytometry as below. Some biopsies were cultured at 37°C, 5% CO₂ for 72 hours and CCL2 levels were determined by ELISA (R&D Systems).

Flow cytometry

For flow cytometry, PBMC were stained with fluorochrome-conjugated antibodies for surface markers (CD14, CD16, HLA-DR, CCR2 (BD-Bioscience)) and fixed by using 2% formaldehyde. For intracellular staining, fixed cells were permeabilized with using the cytofix/cytoperm kit (BD-Bioscience) and stained intracellular with anti-TNF antibody (BD-Bioscience). Samples were evaluated on a FACSCanto II flow cytometer (BD Pharmingen), and analysis was performed using FlowJo software (Tree Star). The cells were gated based on the live cells gate and then gated on monocyte population based on size and complexity.

Statistical analysis

The Mann-Whitney, non-parametric unpaired test was used to assess differences between the groups studied. Paired T test was used to assess differences between different conditions from the same patient.

RESULTS

TNF is produced early after *Leishmania* infection.

CL is an inflammatory disease and the fine balance between pro-inflammatory and regulatory cytokines seems to be important for the control of parasitemia without causing immunopathology. The evaluation of the immune response previous to the development of the ulcerative lesion can determine cytokines that may play a role in ulcer development in CL patients. Many evidences argue in favor that TNF is involved in tissue damage. In order to investigate if this cytokine could contribute to ulcer development we first measured ability of PBMC to secrete TNF in individuals infected with *L. braziliensis* in the pre-ulcerative (early CL) and ulcerative phases (late CL), of disease (Figure 1). High levels of TNF were detected in supernatants of SLA-stimulated PBMC cultures in early CL patients and TNF secretion increase with disease progression (Figure 1). High levels of IFN- γ were detected in the ulcerative phase of the disease as expected but different from TNF, very low levels of IFN- γ was found in CL patients during the early phase of infection.

Monocytes are important source of TNF in CL patients.

Our previous results on long-term PBMC *in-vitro* cultures shows that during CL TNF can be produced by CD4+, CD8+ and CD14+ cells (Follador, Araujo *et al.*, 2002). However, it is known that most effector molecules secreted by monocyte in response to danger signals occurs early after these cells have been stimulated. To determine if monocytes from CL individuals could secrete TNF in short-term cultures we pulsed PBMC with SLA or infected monocytes with *L. braziliensis* and assessed TNF production. After 8 hours of culture monocytes secreted significantly more TNF than CD4+ and CD8+ T cells. TNF was also detected upon infection with *L. braziliensis* (Figure 2 A and B).

Frequency of circulating CD16+ monocytes is increased in CL patients.

It was recently described three subsets of circulating monocytes in healthy individuals based on CD14 and CD16 expression and it was shown that in some inflammatory conditions the frequency of CD16 expressing monocytes were increased. Our previous observation that monocyte-derived macrophages from healthy subjects, individuals with sub-clinical infection and CL patients secrete different amounts of inflammatory mediators after been infected with *Leishmania*, suggest heterogeneity between population of monocytes among these individuals (Giudice, Vendrame *et al.*). We then asked whether CL patients would have unbalance in monocyte subsets frequency. Our gate strategy to identify classical, intermediate and non-classical monocytes was defined based on CD14 / CD16 expression as represented on Figure 3A. We found an increase in intermediate and non-classical monocyte in both early CL and in patients who had already the classical ulcers (Figure 3B).

Status of activation of monocytes subsets.

Activated monocytes can migrate to inflammatory sites and secrete inflammatory mediators, contributing to recruitment of new cells and *Leishmania* killing. The next question we asked was whether there was difference in activation status between monocyte subsets in CL patients. Circulating intermediate monocytes expressed significantly more MHC class II than classical and non-classical ones (Figure 4A and B). In concordance, the intermediate subset secreted more TNF when pulsed with SLA or LPS (Figure 4C and D).

CCL2 and CCR2 expression, and migration to the lesion site.

CCR2 is expressed by mononuclear phagocytes and is one of the main chemokine receptor responsible for monocytes migration to inflammatory sites. It has been shown in a mouse model of *L. major* that inflammatory monocyte migration is dependent on CCR2 (CCL2 ligand) expression (Goncalves, Zhang *et al.*). Thus, we asked whether CCL2 would be produced by PBMC from CL patients. While low levels of CCL2 were found in PBMC cultures from healthy subjects, high levels of this chemokine were produced by PBMC from CL patients (Figure 5A). To determine if CCL2 was produced by cells from lesions of late CL patients we cultured late CL lesion tissues obtained by biopsy for 72 hours and found high levels of CCL2 on supernatants of the majority of these cultures (Figure 5B). To determine the ability of subsets of monocytes to respond to CCL2 we then investigated the presence of CCR2 among monocyte subsets. Interestingly, only classical and intermediates monocytes expressed CCR2 (Figure 5C). To assess the frequency of monocyte subsets within lesion of CL patients we stained biopsies from these subjects for MHC class II, CD14 and C16. In the lesion site cells with the phenotype CD14^{dim}CD16⁺ (non-classical monocyte) were more prevalent, followed by CD14⁺CD16⁻ ones (Figure 5D).

DISCUSSION

The study of the early events driving immunopathology in parasitic diseases may reveal key molecules and cell types responsible for inflammation in these conditions. CL due to *L. braziliensis* infection is an example where inflammation has a main role in induction of ulcer development. It is known that TNF and IFN- γ are the main inflammatory cytokines secreted by SLA-stimulated PBMC cultures from CL patients, and also highly expressed in lesions from these individuals. Recently, a positive correlation between the levels of TNF with disease severity has been documented (Follador, Araujo *et al.*, 2002; Antonelli, Dutra *et al.*, 2005). While in tegumentary leishmaniasis mononuclear phagocytes are important source of TNF, CD4⁺ T cells is the main cell type secreting IFN- γ (Follador, Araujo *et al.*, 2002). In most of the immunological studies performed in CL patients the immune response was evaluated at the time that the lesion had already been established (late CL), what impairs the discovery of factors that contribute to disease expression. In our study we compared immune response from CL patients due to *L. braziliensis* before the ulcer development

(early CL) with individuals with classical ulceration (late CL). We found that early after infection, the levels of TNF, but not IFN- γ , were increased in these individuals and intermediate monocytes were the main source of TNF. Moreover, the documentation of the increased frequency of intermediate and non-classical monocytes before ulcer appearance pointed out for the key role of these cells in the pathogenesis of CL.

To address the question whether TNF could be produced by monocytes shortly after contact with *Leishmania* or its products, we stimulated monocytes from CL patients with SLA and LPS, and also infected them with *L. braziliensis*. Not only SLA, but also live parasite, induced high frequency of TNF-producing monocytes detected after 6 hours. These data was similarly observed in our previous report using mouse model, where live *L. major* induced TNF by DC (Carvalho, Pearce *et al.*, 2008). It has been reported that a few components of *Leishmania* parasites, as LPG and DNA, activates cells through TLR2 and 9, respectively, and we are currently investigating whether these TLRs can trigger immune responses in human monocytes infected by *L. braziliensis* (Carvalho, Petritus *et al.*, ; Kavooosi, Ardestani *et al.*, 2009).

It has been shown that the frequency of CD16+ monocytes is increased in ulcers of patients with CL (Soares, Barral *et al.*, 2006). Here by phenotypic and functional characterization of monocytes we found that early after infection CL patients have already increased frequency of both, intermediate and non-classical monocytes. The up-regulation of CD16 is induced by cytokines as TGF- β 1 and TNF (Wahl, Allen *et al.*, 1992). As TNF is increased early after infection it is likely that this cytokine is involved in circulating monocyte differentiation in CL patients. We also investigated MHC class II expression and the ability of monocyte subsets to produce TNF, and found that intermediate monocytes express more MHC class II and secrete more TNF in response to SLA and LPS. This data is in concordance with what has been seen in healthy subjects where non-classical population is less responsive to LPS (Zawada, Rogacev *et al.*). One reason why non-classical monocytes do not respond well to LPS may be due the low expression of CD14 within this population.

Because of the lack of animal models to study the intermediate population of monocytes, little is not known about the dynamics of this population regarding migration from peripheral blood to inflamed tissues. While intermediate monocytes are the main activated subset in peripheral blood from *L. braziliensis*-infected individuals the non-

classical subpopulation were the most frequent in ulcerated lesions. Thus, either the intermediate population is not the preferred population migrating to lesion of these individuals or these cells downregulate CD14 expression as they reach lesion site. As plasticity between myeloid cells subsets has been reported (Biswas e Mantovani, ; Mosser e Edwards, 2008), two evidences argue in favor of intermediate monocytes decrease CD14 expression becoming cells with the non-classical phenotype: first, the lesion site is an inflamed environment and it has been shown that activated monocytes shed CD14 molecules (Bazil e Strominger, 1991). Second, our results showed that classical and intermediate populations express CCR2, a chemokine receptor that binds to CCL2, which is expressed both, in PBMC and in lesion cultures from CL patients.

Altogether our data shows that intermediate monocytes is the main inflammatory cell in CL patients and the increasing the frequency of this population and TNF production occur early after infection, before the ulcer appearance, and remains with progression of the infection to ulcer development. Many pathological events preceding and during inflammatory responses can be attributed to the effect of TNF. For instance, TNF increases cytotoxicity, expression of metalloproteinases and necrosis (Chakrabarti, Zee *et al.*, 2006). Therefore, our data not only contribute to understanding of the role of monocytes in the pathogenesis of *L. braziliensis* infection but also may be considered for future immunotherapy studies. As patients with early CL have a high rate of failure to antimony therapy, targeting CD16+ cells early during infection in associated with leishmanicidal drug may be a candidate for therapeutic approach to prevent tissue damage and ulcer development in CL patients.

FIGURES LEGENDS

Figure 1.

TNF levels from CL patients are increased in the pre-ulcerative phase of the disease. Peripheral blood mononuclear cells from early CL and late CL patients were pulsed with 5 µg/ml of SLA and incubated for 72 hours. Cytokines levels were determined on cell cultures supernatants by ELISA. Results are mean (+/- SD) from 17 individuals from each group.

Figure 2.

Monocytes contribute to TNF production in CL patients. Peripheral blood mononuclear cells were pulsed with 5 µg/ml of SLA or infected with *L. braziliensis* on a ratio of 5 parasites / monocyte. After 8 hours incubation in presence of Stop Golgi intracellular staining was performed to determine the frequencies of TNF producing cells by flow cytometry. Plots are representative of 5 healthy individuals.

Figure 3.

CL patients have increased frequency of intermediate and non-classical monocytes in the blood. Peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects, early cutaneous leishmaniasis patients and cutaneous leishmaniasis patients were obtained and monocytes subpopulations frequency were assessed by flow cytometry. *A*, Gate strategy to assess monocytes subsets. *B*, Frequency of monocytes subsets in healthy subjects, early CL and late CL patients. The results expressed are the mean (+/- SD) from 15 individuals from each group of individuals. Lines indicate statistical significance ($p < 0.05$).

Figure 4.

Intermediate monocytes retain an inflammatory phenotype. Peripheral blood mononuclear cells from cutaneous leishmaniasis patients were obtained and analysed for MHC class II expression and TNF-alpha production by flow cytometry. *A*, *Ex-vivo* staining for MHC class II expression in different monocytes populations, as indicated. *B*, Bars indicates mean (+/- SD) of MHC II mean of fluorescent intensity (MFI) from 15 CL patients. *C*, Intracellular staining for TNF-alpha on monocytes subpopulations after been stimulated with soluble *Leishmania* antigen (SLA) (5 µg/ml) or LPS (10 ng/ml) for 8 hours in presence of Stop Golgi. *D*, Bars represent the mean (+/- SD) of TNF-alpha production from 5 CL patients.

Figure 5.

Chemokines and chemokines receptors expression. A, Peripheral blood mononuclear cells from health individuals, early CL and CL patients were cultured in presence of SLA (5 µg/ml) for 72 hours. B, Biopsies from CL patients were obtained and cultured for 72 hours. CCL2 levels were determined by ELISA on biopsies supernatants. C, Expression of CCR2 on circulating monocyte subsets from CL patients determined by flow cytometry, *ex vivo*. D, B, Frequency of mononuclear phagocyte subsets within biopsies from CL patients determined by flow cytometry, *ex vivo*.

REFERENCES

- 1 Barral, A., Barral-Netto, M., Almeida, R., de Jesus, A. R., Grimaldi Junior, G., Netto, E. M., Santos, I., Bacellar, O. and Carvalho, E. M., Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am J Trop Med Hyg* 1992. 47: 587-592.
- 2 Barral, A., Guerreiro, J., Bomfim, G., Correia, D., Barral-Netto, M. and Carvalho, E. M., Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 1995. 53: 256-259.
- 3 Faria, D. R., Gollob, K. J., Barbosa, J., Jr., Schriefer, A., Machado, P. R., Lessa, H., Carvalho, L. P., Romano-Silva, M. A., de Jesus, A. R., Carvalho, E. M. and Dutra, W. O., Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 2005. 73: 7853-7859.
- 4 Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W. O., Gollob, K. J. and Carvalho, E. M., Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 2002. 70: 6734-6740.
- 5 Carvalho, L. P., Passos, S., Bacellar, O., Lessa, M., Almeida, R. P., Magalhaes, A., Dutra, W. O., Gollob, K. J., Machado, P. and de Jesus, A. R., Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol* 2007. 29: 251-258.
- 6 Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R. P., Lessa, H., Bacellar, O. and Carvalho, E. M., Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 1998. 31: 143-148.

- 7 Giudice, A., Vendrame, C., Bezerra, C., Carvalho, L. P., Delavechia, T., Carvalho, E. M. and Bacellar, O., Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis.* 12: 75.
- 8 Antonelli, L. R., Dutra, W. O., Almeida, R. P., Bacellar, O., Carvalho, E. M. and Gollob, K. J., Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 2005. 101: 226-230.
- 9 Lessa, H. A., Machado, P., Lima, F., Cruz, A. A., Bacellar, O., Guerreiro, J. and Carvalho, E. M., Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 2001. 65: 87-89.
- 10 Machado, P. R., Lessa, H., Lessa, M., Guimaraes, L. H., Bang, H., Ho, J. L. and Carvalho, E. M., Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2007. 44: 788-793.
- 11 Carvalho, L. P., Passos, S., Schriefer, A. and Carvalho, E. M., Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol.* 3: 301.
- 12 Belge, K. U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T. and Ziegler-Heitbrock, L., The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002. 168: 3536-3542.
- 13 Ziegler-Heitbrock, H. W., Fingerle, G., Strobel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schutt, C., Passlick, B. and Pforte, A., The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 1993. 23: 2053-2058.
- 14 Fingerle, G., Pforte, A., Passlick, B., Blumenstein, M., Strobel, M. and Ziegler-Heitbrock, H. W., The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 1993. 82: 3170-3176.
- 15 Kawanaka, N., Yamamura, M., Aita, T., Morita, Y., Okamoto, A., Kawashima, M., Iwahashi, M., Ueno, A., Ohmoto, Y. and Makino, H., CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002. 46: 2578-2586.
- 16 Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R. R., Fliser, D. and Heine, G. H., SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood.* 118: e50-61.
- 17 Soares, G., Barral, A., Costa, J. M., Barral-Netto, M. and Van Weyenbergh, J., CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol* 2006. 79: 36-39.

- 18 Conrad, S. M., Strauss-Ayali, D., Field, A. E., Mack, M. and Mosser, D. M., Leishmania-derived murine monocyte chemoattractant protein 1 enhances the recruitment of a restrictive population of CC chemokine receptor 2-positive macrophages. *Infect Immun* 2007. 75: 653-665.
- 19 Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A. and Mosser, D. M., Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of Leishmania major infection. *J Exp Med.* 208: 1253-1265.
- 20 Willenborg, S., Lucas, T., van Loo, G., Knipper, J. A., Krieg, T., Haase, I., Brachvogel, B., Hammerschmidt, M., Nagy, A., Ferrara, N., Pasparakis, M. and Eming, S. A., CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood.* 120: 613-625.
- 21 Carvalho, L. P., Pearce, E. J. and Scott, P., Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with Leishmania braziliensis: infected cells produce high levels of TNF-alpha, whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell responses. *J Immunol* 2008. 181: 6473-6480.
- 22 Carvalho, L. P., Petritus, P. M., Trochtenberg, A. L., Zaph, C., Hill, D. A., Artis, D. and Scott, P., Lymph node hypertrophy following Leishmania major infection is dependent on TLR9. *J Immunol.* 188: 1394-1401.
- 23 Kavooosi, G., Ardestani, S. K. and Kariminia, A., The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to Leishmania major phosphoglycans (PGs). *Parasitology* 2009. 136: 1193-1199.
- 24 Wahl, S. M., Allen, J. B., Welch, G. R. and Wong, H. L., Transforming growth factor-beta in synovial fluids modulates Fc gamma RII (CD16) expression on mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1992. 148: 485-490.
- 25 Biswas, S. K. and Mantovani, A., Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 11: 889-896.
- 26 Mosser, D. M. and Edwards, J. P., Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008. 8: 958-969.
- 27 Bazil, V. and Strominger, J. L., Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol* 1991. 147: 1567-1574.
- 28 Chakrabarti, S., Zee, J. M. and Patel, K. D., Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J Leukoc Biol* 2006. 79: 214-222.

FIGURES

Figure 1

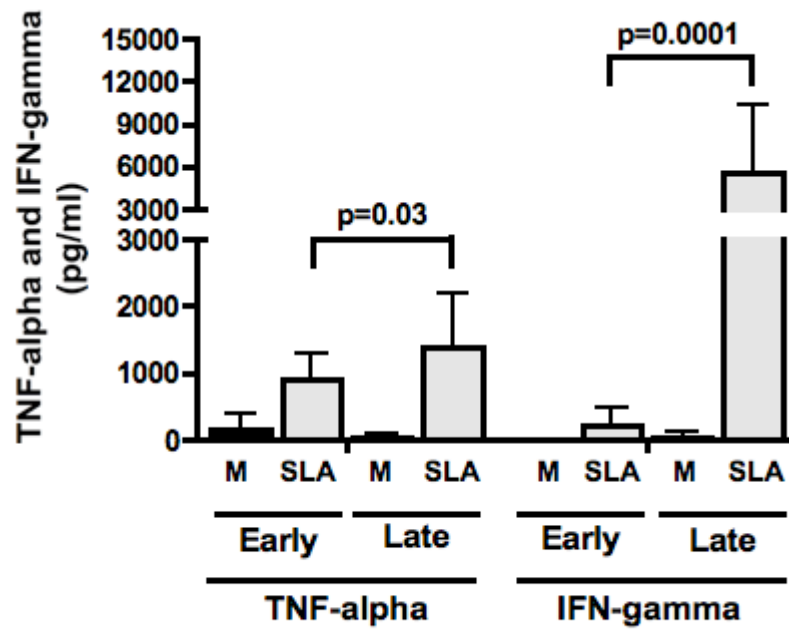


Figure 2

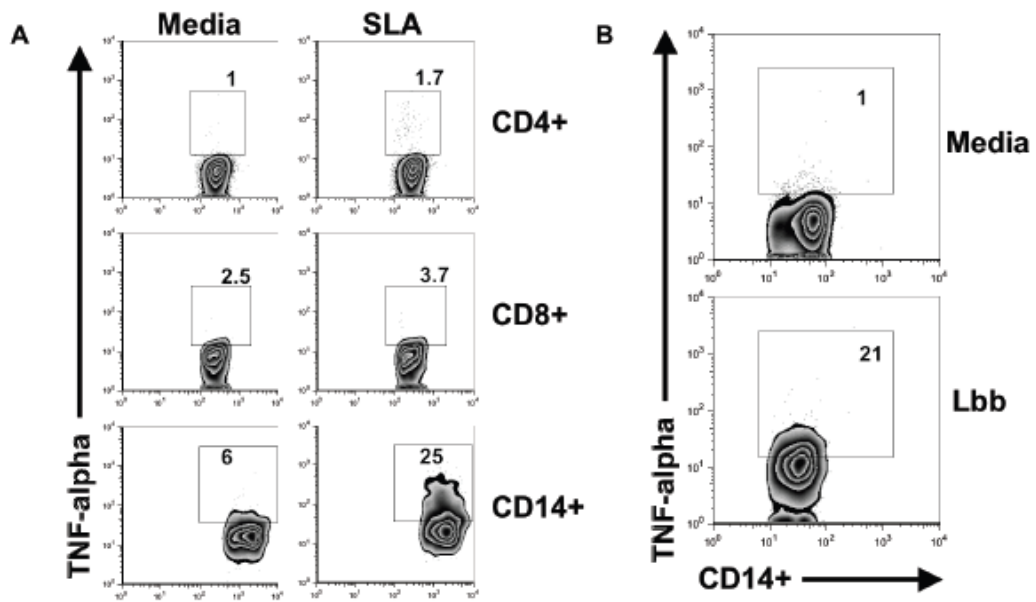


Figure 3

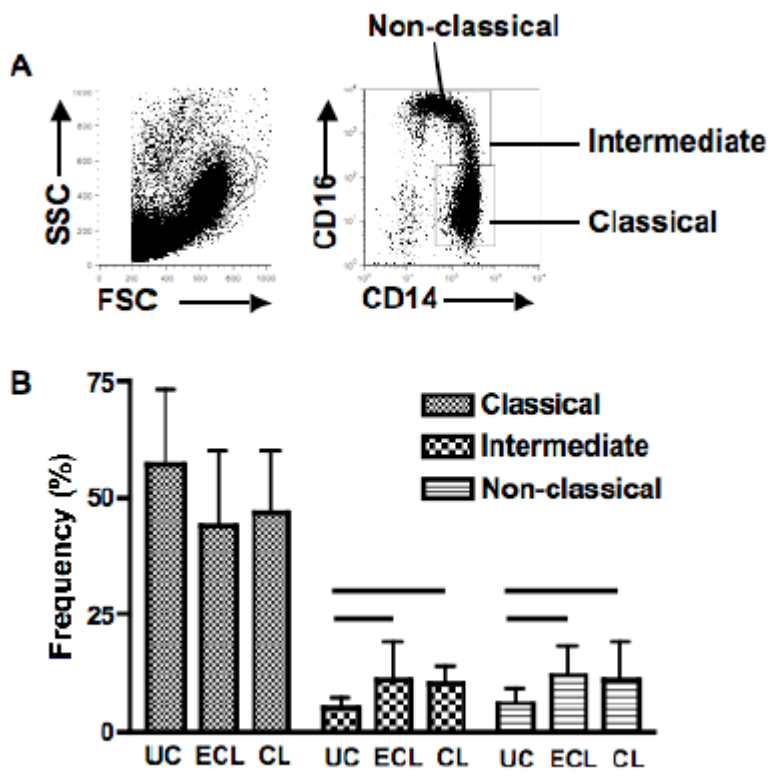


Figure 4

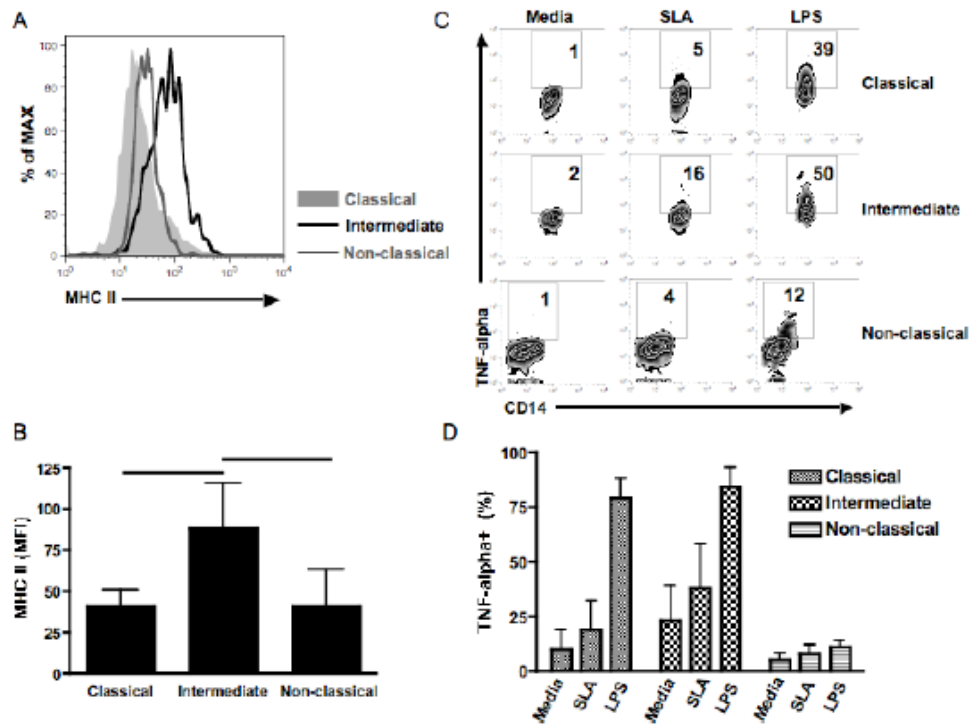
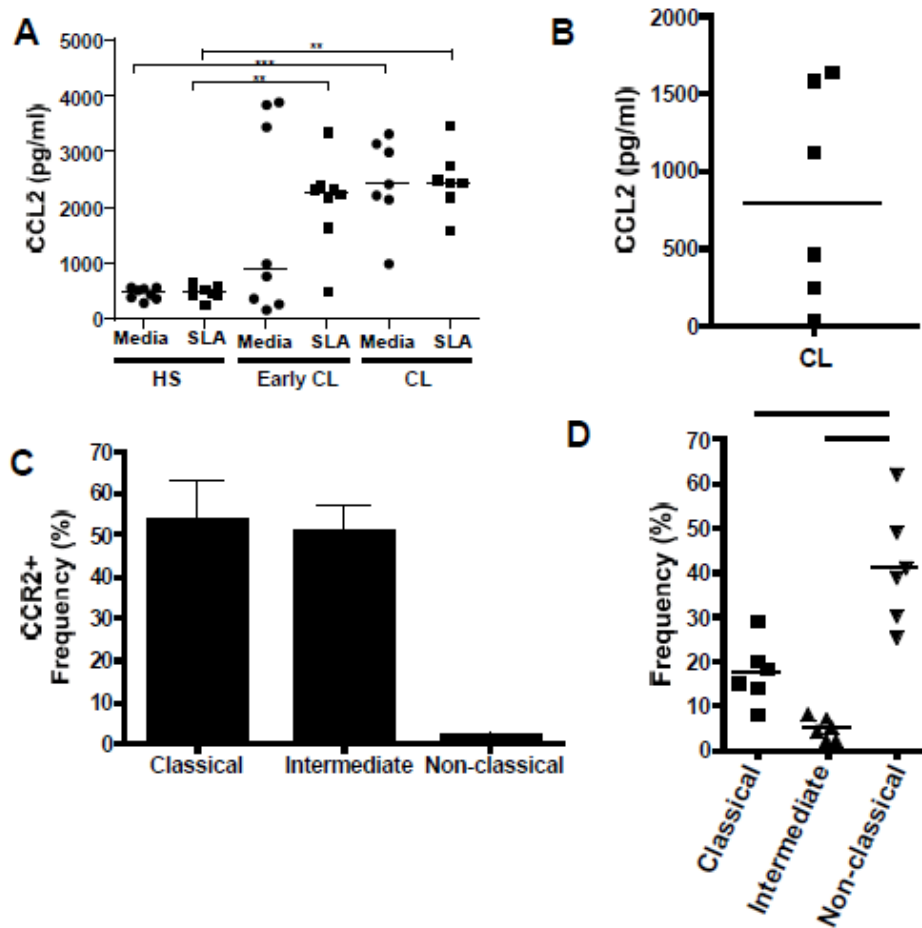


Figure 5



VII. RESULTADOS

1. Níveis de TNF são elevados nos pacientes com leishmaniose cutânea

Pacientes com leishmaniose cutânea produzem altos níveis de TNF, citocina pró-inflamatória que contribui para o dano tecidual nesses indivíduos. Para determinar se a produção de TNF ocorre na fase inicial da doença, nós comparamos a produção de TNF por CMSP de pacientes com LCR com a de pacientes com LC. Observamos que no início da doença, células mononucleares de pacientes com LC secretam altos níveis de TNF, e após a úlcera estabelecida observa-se um aumento na produção dessa citocina em resposta ao antígeno de *Leishmania*. Nos mesmos sobrenadantes de cultura dosamos IFN- γ com a finalidade de investigar se essa citocina também estaria aumentada na fase inicial da doença. Diferente de TNF, os níveis de IFN- γ não se mostraram aumentados na fase inicial da doença, porém como esperado, altos níveis IFN- γ foram observados em pacientes com a forma ulcerada da doença (Figura 1).

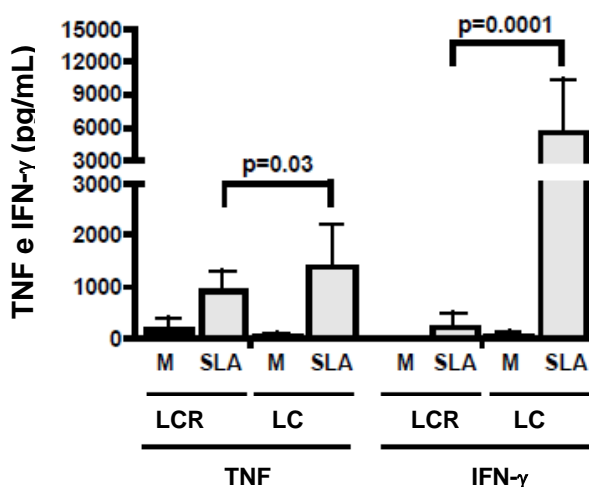


Figura 1. Produção exacerbada de TNF na LC. Sobrenadantes de CMSP de pacientes com LC (N=15) e LCR (15). Foram colhidos após 72 horas e os níveis de TNF e IFN- γ foram determinados por ELISA. Para análise estatística foi usado teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. (*p<0,03, ***p<0,0001).

2. Monócitos são importantes fontes celulares para produção de TNF em infecção por *L. braziliensis*

Observamos a produção de TNF em CMSP sem estímulo e estimuladas com antígeno SLA, além da infecção por *L. braziliensis in-vitro*. Células de pacientes com LC foram marcadas com os anticorpos CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ para verificar a fonte celular produtora de TNF. Nas culturas estimuladas por SLA, a frequência de células produtoras de TNF foi maior nas células estimuladas quando comparadas a frequência de células positivas para TNF, observamos que as células CD14⁺ são as produtoras de TNF (Figura 2 A). Na infecção de monócitos *in-vitro* por *L.braziliensis* (11245) houve um aumento considerável na produção de TNF (Figura 2B) realizado por citometria de fluxo.

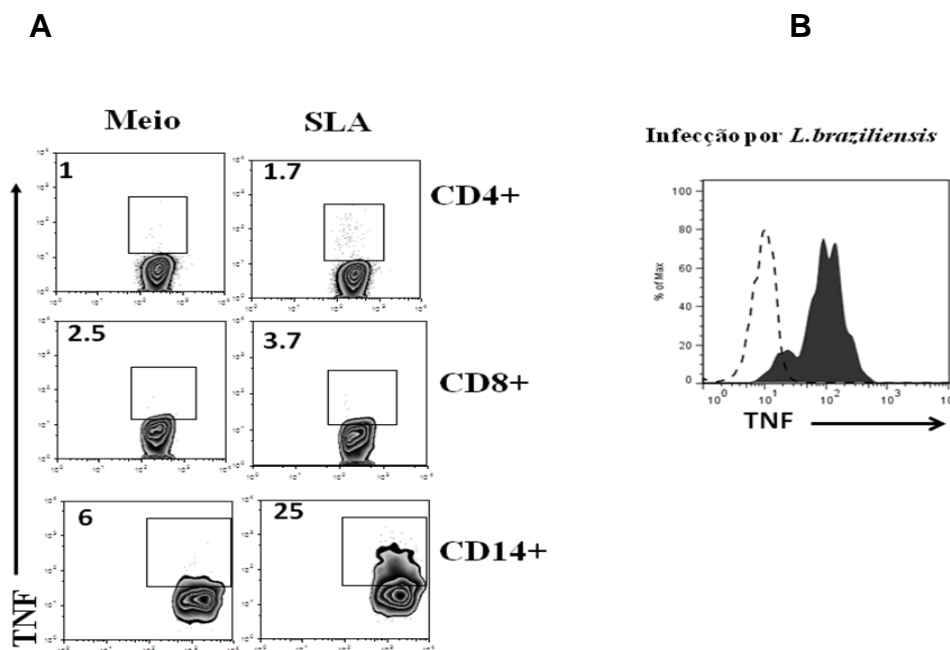


Figura 2. Fonte celular de TNF. CMSP de pacientes com LC foram cultivadas por 6 horas na presença de brefeldina e marcadas intracelular para TNF. Plot representativo de 05 experimentos. **Figura 2B.** Histograma representativo da produção de TNF por monócitos sem estímulo (linha tracejada), e após infecção por *L.braziliensis* (plot sólido) na proporção de 5 parasitos / monocitos. A produção de TNF foi determinada depois de 6 horas de incubação com brefeldina. Histograma representativo de 5 experimentos.

3. Caracterização das diferentes subpopulações de monócitos no sangue de pacientes infectados com *L. braziliensis* e indivíduos sadios

Foi recentemente demonstrado que a população de monócitos no sangue periférico de humanos é heterogênea, sendo essas células classificadas em clássicos, intermediários e não-clássicos de acordo com a expressão de CD14 e CD16. A figura 3A mostra as regiões onde foram feitas as análises de acordo a expressão de CD14 e CD16. A figura 3B mostra a frequência destas subpopulações em indivíduos sadios, pacientes com LCR e com LC. Os pacientes com leishmaniose cutânea recente e leishmaniose cutânea apresentaram maior frequência dos monócitos intermediários e não-clássicos em relação aos indivíduos sadios ($p < 0,001$).

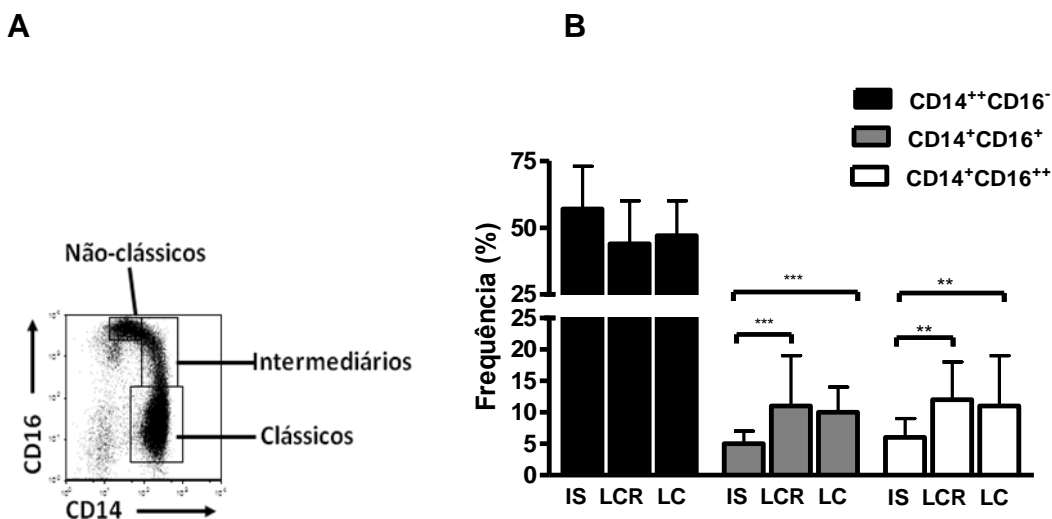


Figura 3. Análise *ex-vivo* da frequência das subpopulações de monócitos. (A) Plot representativo das subpopulações de monócitos em um indivíduo com leishmaniose cutânea identificando-as como: Clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), Intermediários (CD14⁺CD16⁺) e Não-Clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺). **(B)** Frequência das subpopulações de monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea recente (LCR, n=15), leishmaniose cutânea (LC, n=15) e indivíduos sadios (IS, n=15). Os monócitos foram caracterizados de acordo a expressão da molécula CD16⁺ na superfície celular, analisadas por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em frequência. Um total de 250.000 eventos foi usado para cada amostra. Os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram usados para analisar as diferenças estatísticas entre grupos. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,0029$.

4. Avaliação do grau de ativação das diferentes subpopulações de monócitos de pacientes infectados com *L. braziliensis* e indivíduos saudáveis.

Diante da observação de que as subpopulações de monócitos intermediários e não-clássicos foram mais frequentes em pacientes com LC e LCR, e considerando que a mudança de fenótipos destes monócitos pode influenciar na patogênese da leishmaniose cutânea resolvemos portanto, avaliar qual destas subpopulações se apresenta mais ativada através da expressão de MHC classe II. Nossos resultados mostraram que os monócitos intermediários expressam altos níveis de MHCII quando comparados com os clássicos e não-clássicos ($p < 0,001$) (Fig. 4B).

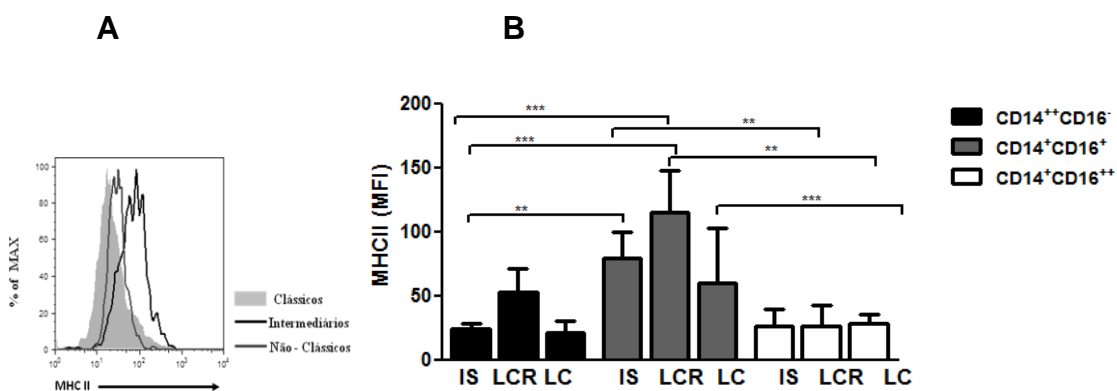


Figura 4. Estado de ativação das subpopulações de monócitos: (A) Histograma representativo da intensidade de fluorescência de MHC classe II das três subpopulações de monócitos. **(B)** Dado representativo (media +/- desvio padrão) da intensidade de fluorescência de MHC classe II de Inivíduos Sadios (n=09), pacientes com LCR (N=09) e pacientes com LC (n=09). Para o cálculo de significância estatística foi utilizado Kruskal Wallis acompanhado do pós-teste Dunns para as diferenças estatísticas entre as subpopulações de monócitos: ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

5. Monócitos clássicos e intermediários são as principais células produtoras de TNF

Para determinar qual das subpopulações de monócitos está relacionada com a produção de TNF, CMSP de 5 pacientes LC foram colocadas em cultura sem estímulo, ou na presença de SLA ou LPS. Após 6 horas de cultura, observamos que monócitos intermediários são os principais secretores de TNF, seguidos da população de clássicos, independente do estímulo (Figura 5).

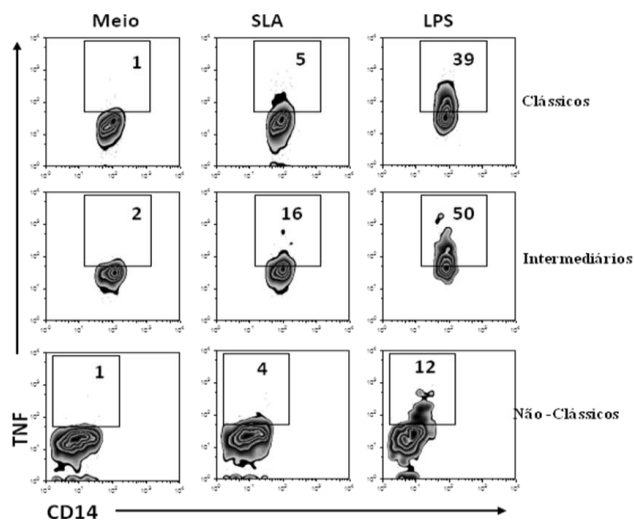


Figura 5. Produção de TNF por subpopulações de monócitos. Frequência das subpopulações de monócitos produtores de TNF, em pacientes com LC (N=5). Plots representativos de culturas sem estímulo, estimuladas com SLA ou sob estímulo de LPS por 6 horas na presença de brefeldina. As regiões foram delimitadas de acordo com a marcação de superfície para CD14 e CD16.

6. Expressão elevada de CCL2 em pacientes com leishmaniose cutânea

CCL2 é a principal citocina envolvida no recrutamento de linfócitos e monócitos para o sítio inflamatório. Os níveis de CCL2 foram determinados em sobrenadantes de cultura de CMSP em indivíduos saudios, pacientes com LCR, pacientes com LC e em sobrenadantes de biópsias de pacientes LC. Antígeno solúvel de *Leishmania* (5µg/mL) foi adicionado às culturas de CMSP e observamos que a expressão de CCL2 foi maior nas culturas não estimuladas e estimuladas com SLA de pacientes LCR e LC, quando comparados com indivíduos saudios (Figura 6A). Também encontramos expressão de CCL2 em biópsias de pacientes com LC (Figura 6B).

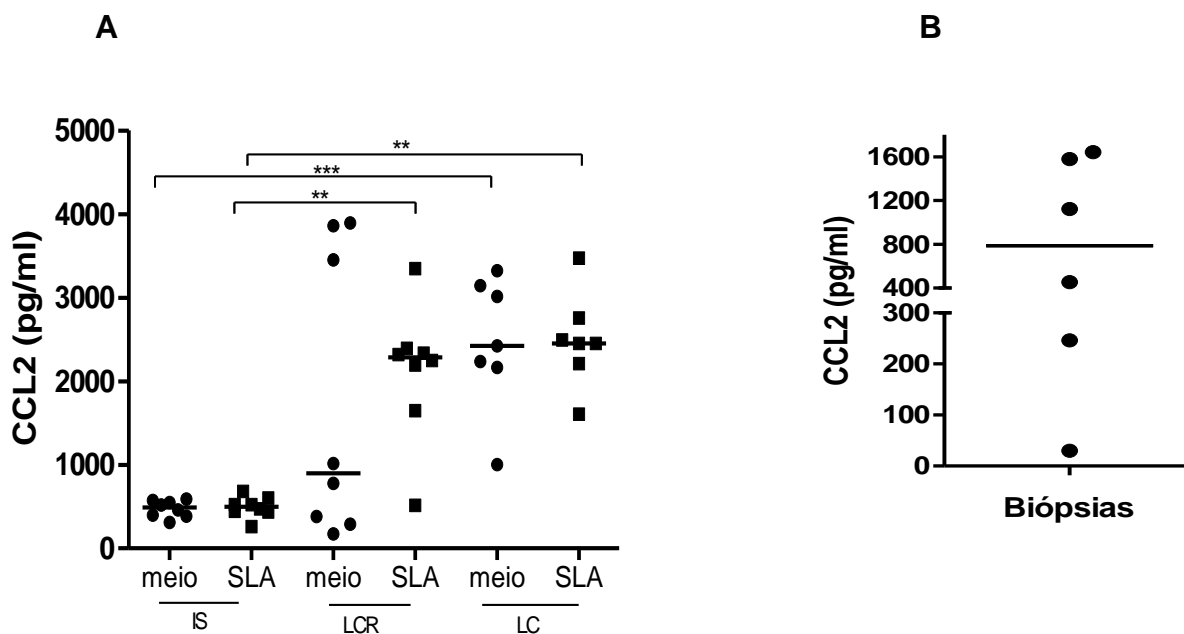


Figura 6: Expressão elevada de CCL2 no sangue periférico de indivíduos saudios, pacientes com LCR e LC e em sobrenadantes de biópsias de pacientes com LC. (A) Níveis de CCL2 em cultura de CMSP (72h) de IS (N=8), pacientes com LCR (N=8) e LC (N=7). SLA (5µg/mL) foi adicionado às culturas (B) Níveis de CCL2 em biópsia de pacientes LC (N=6). CCL2 foi dosado através da técnica de ELISA e os resultados expressos em pg/mL. Para o cálculo de significância estatística foi usado ANOVA acompanhado do pós-teste Tuckey para as diferenças estatísticas entre as subpopulações de monócitos: *** p<0,001.

7. Frequência de CD14 e CD16 em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea.

Como encontramos frequência aumentada de monócitos de CD16+ no sangue periférico de pacientes com LC e sabemos que a lesão desses pacientes é predominantemente composta por células mononucleares o próximo passo foi determinar a frequência das três populações de monócitos nas biópsias de pacientes com LC. Observamos que células com fenótipo CD14+CD16+ eram as mais frequentes, seguidas de células CD14⁺⁺CD16⁻ (figura 6).

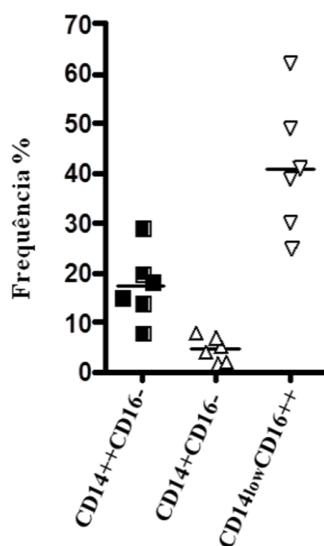


Figura 7. Frequência das subpopulações de monócitos em biópsias de pacientes LC. Biópsias de pacientes com LC (n=6) foram tratadas com colagenase por 1 hora, maceradas e marcadas com anticorpos para CD11b, CD14 e CD16, e adquiridas no citômetro de fluxo. As regiões de análise foram delimitadas nas células CD11b+.

VIII. DISCUSSÃO

Monócitos são células fagocíticas circulantes de grande importância para a resposta imune contra *Leishmania*, desde quando estas células migram para o sítio de infecção podendo se diferenciar em macrófagos, principais células destruidoras de patógenos intracelulares, ou células dendríticas, principais células apresentadoras de antígeno. Estudos recentes têm mostrado a heterogeneidade de monócitos circulantes em humanos e o papel desses diferentes tipos celulares em diversas patologias. Assim, foi demonstrado que baseado na expressão de monócitos CD16 circulantes podem ser divididos em clássicos, intermediários e não-clássicos (Zeigler-Heitbrock, 2007). Aumento das populações de monócitos que expressam CD16 tem sido documentado em diversas doenças inflamatórias a exemplo da artrite reumatóide e sepse. Assim, a fim de determinar o papel das subpopulações de monócitos para a patogênese da LC, nós analisamos o perfil de expressão de CD16 em monócitos circulantes de pacientes com LC durante a fase inicial da doença e após o desenvolvimento da úlcera, determinando a contribuição dessas células para a produção de TNF, uma citocina pró-inflamatória conhecida por contribuir para a evolução da doença. No nosso estudo verificamos que a frequência de monócitos CD16+ (intermediários e não-clássicos) estavam aumentadas ainda no início da infecção por *L. braziliensis* e que os intermediários eram o sub-grupo mais ativados e maior produtor de TNF.

IFN- γ e TNF são citocinas produzidas em níveis elevados por CMSP de pacientes com LC após estímulo com SLA, e induzem ativação de macrófagos para destruição de patógenos intracelulares. No entanto, estudos tem sugerido que a produção exacerbada e não-modulada dessas citocinas durante a infecção por *L. braziliensis* podem contribuir para dano tecidual e desenvolvimento da ulcera. Por exemplo, pacientes com LM, forma mais severa de leishmaniose por *L. braziliensis*, secretam níveis mais altos de IFN- γ e TNF do que pacientes com LC; Existe correlação positiva entre produção de IFN- γ e TNF com o infiltrado inflamatório e tamanho da lesão de pacientes com LC; Tratamento de pacientes com LC refratários ao antimonial pentavalente se

beneficia da utilização de pentoxifilina, droga que diminui a produção de TNF (Machado, Rosa *et al.*, 2011;Oliveira, Bafica *et al.*, 2011; Antonelli, Dutra *et al.*, 2005).. Na tentativa de determinar se os níveis elevados dessas citocinas poderiam estar contribuindo para o desenvolvimento da lesão nesses indivíduos, avaliamos a produção de IFN- γ e TNF de pacientes com LC na fase inicial (antes do aparecimento da úlcera) e na fase tardia da doença (úlcera estabelecida), em resposta ao SLA. Observamos que enquanto os níveis de TNF estavam altos em pacientes com LCR, esses indivíduos não produziam IFN- γ na fase inicial da doença. Desde quando, a despeito do tratamento na fase inicial da doença, a maioria desses pacientes com LCR evoluíram para LC, sugerimos que os níveis altos de TNF devam estar associados ao desenvolvimento da lesão (Unger, O'neal *et al.*, 2009). Diferentemente, na fase tardia da doença os níveis de IFN- γ estavam aumentados, o que está associado à baixa carga parasitaria nessa fase da doença. Dados recentes do nosso grupo mostrando que os níveis de TNF e IFN- γ de indivíduos curados de LC diminuem após cicatrização reforçam essa hipótese (Carvalho, A M, dados não publicados). Dessa forma, acreditamos que enquanto TNF participa da patogênese da doença, IFN- γ é responsável pelo controle da multiplicação de parasitos.

Várias são as fontes de TNF durante um processo infeccioso, incluindo linfócitos e células da linhagem mielóide. Em culturas de CMSP de pacientes com LC estimuladas com SLA foi visto que tanto linfócitos CD4+ e CD8+, como monócitos eram capazes produzir essa citocina (Gaze, Dutra *et al.*, 2006). Entretanto, esses estudos avaliaram resposta imune de pacientes com LC em ensaios onde as células foram cultivadas *in vitro* por um período longo de incubação, e nesse caso, a resposta de monócitos ao SLA poderia estar sendo influenciada por citocinas secretadas por células T, incluindo IFN- γ . Para avaliar a capacidade de monócitos de pacientes com LC de produzir TNF independente da ação autócrina ou parácrina de outras citocinas, estimulamos com SLA CMSP de pacientes com LC por 6 horas na presença de brefeldina. Observamos que nesse período curto de cultura, os monócitos eram fontes importantes de TNF. Infecção com *L. braziliensis* também induziu produção de TNF por monócitos após 6 horas de cultura, mostrando que não só

componentes do parasito como também a infecção com microorganismos vivos induzem a produção dessa citocina. Alguns trabalhos tem descrito que componentes da *Leishmania*, a exemplo do LPG e DNA, ativam células da resposta imune inata via ligação com TLRs. No momento estamos tentando identificar a participação de TLR2, 4 e 9 na ativação e produção de citocinas por subpopulações de monócitos após infecção por *L. braziliensis*.

Em humanos, tem se mostrado que as subpopulações de monócitos circulantes são heterogêneas não apenas do ponto de vista fenotípico, mas também funcional, uma vez que essas células contribuem de forma diferente no que diz respeito a proteínas secretadas. Isso foi recentemente visto através da purificação das três subpopulações, estimulação *in vitro* e elaboração de bancos de expressão gênica (Zawada, Rogacev *et al.*, 2011). Assim, tem sido documentado aumento da frequência de monócitos intermediários e não-clássicos (ambos CD16+) em indivíduos com doenças inflamatórias. A exemplo, associação entre o aumento da frequência de monócitos CD16+ e doenças cardiovasculares e relação entre evolução da cirrose com a mudança de fenótipo de monócitos clássicos para não-clássicos, foram descritos (Zimmermann, Seidler *et al.*, 2010; Heine, Ulrich *et al.*, 2008). A fim de investigar a contribuição de subpopulações de monócitos para a produção de TNF, nós estimulamos CMSP de pacientes com LC com SLA e LPS. Enquanto monócitos intermediários expressavam mais MHC classe II e produziam mais TNF, os não-clássicos tiveram baixa resposta ao SLA e LPS. O estudo de Zawada e cols. indicou que monócitos não-clássicos expressam menos TLR, o que talvez possa explicar a baixa produção de TNF por essas células, mesmo após serem estimuladas por LPS. Outra possível explicação é que, evidentemente, os monócitos não-clássicos tem diminuição de expressão de CD14 na superfície, o que implica numa baixa resposta ao LPS.

Apesar da existência de células da linhagem mielóide residentes em compartimentos periféricos, a migração de monócitos do sangue para o local da infecção é essencial para o controle da multiplicação de patógenos intracelulares, incluindo *Leishmania*. Recentemente, foi demonstrado em modelo experimental que monócitos inflamatórios eram as primeiras células a chegar no sítio de infecção e eram capazes de destruir *L. major* (Gonçalves,

Zhang et al., 2011). Nesse estudo, também foi demonstrado que o recrutamento de monócitos inflamatórios para o sítio da infecção foi dependente de CCL2, citocina que contribui para o recrutamento de células da linhagem mielóide. No nosso estudo, observamos que os níveis de CCL2 estavam aumentados em sangue periférico de pacientes com LC, mesmo na fase inicial da doença, e foi também encontrado CCL2 em sobrenadantes de culturas de biópsias de pacientes com LC. Como vários tipos celulares secretam CCL2, incluindo células da linhagem mielóide e células mesenquimais, o nosso próximo objetivo é determinar a fonte dessa quimiocina. Análises histológicas de lesões de pacientes com LC mostram angiogênese e infiltrado, predominantemente, mononuclear (Bittencourt e Barral, 1991). A fim de determinar o fenótipo das células da linhagem mielóide presentes nas biópsias de pacientes com LC, nós marcamos biópsias com anticorpos anti-CD11b, MHC classe II, CD14 e CD16. Encontramos que a maioria das células CD11b⁺ presentes na lesão de pacientes com LC eram CD14⁺CD16⁺⁺ (fenótipo semelhante ao de monócitos não-clássicos), seguidas de CD14⁺CD16⁻ (fenótipo semelhante ao de monócitos clássicos). Embora esses achados sejam importantes para o ponto de vista de caracterização fenotípica, talvez os achados da lesão não reflitam o que ocorre no sangue periférico, principalmente pelo fato de que mudanças no fenótipo (passar a expressar ou perder a expressão de CD16) durante a migração do sangue para a lesão possam ocorrer devido às diferenças nos microambientes. Assim, um estudo funcional de células da lesão de pacientes com LC se faz necessário.

Um dos principais desafios para desenvolvimento de uma vacina contra a LC é o fato de que esses pacientes desenvolvem resposta inflamatória, que ajuda no controle da carga parasitaria. Assim, a indução desse tipo de resposta por uma vacina poderá levar ao aumento da lesão. Outro desafio diz respeito ao tratamento: a maioria dos pacientes tratados na fase inicial da doença evolui para a forma ulcerada. Dessa forma, estudos que visam identificar as células ou moléculas que participam na patogênese da doença poderão contribuir para o desenvolvimento de novas formas de imunoterapia. No nosso estudo observamos que monócitos intermediários (CD16⁺) são os mais ativados e a principal fonte de TNF. Ainda observamos que CCL2 é secretada na fase inicial

da doença. Assim, essas moléculas podem servir como alvos para ensaios de imunoterapia.

XIX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

A participação da imunidade do hospedeiro na patologia da leishmaniose cutânea tem sido bem documentada. O efeito dessa resposta é mediado por participação de várias células que produzem citocinas e quimiocinas como mediadores inflamatórios. Nossos dados mostram a importância clínica de monócitos produzindo citocinas, principalmente TNF, envolvida no desenvolvimento da úlcera. O equilíbrio dessa resposta é necessário para que ocorra a cura da lesão. Nosso grupo tem feito uma caracterização destas subpopulações de monócitos e avaliado seu grau de ativação no sangue periférico de pacientes infectados por *L.braziliensis*, durante a evolução clínica da LC. Durante a lesão recente o paciente apresenta uma pápula (lesão não ulcerada) na maioria das vezes acompanhada de linfadenopatia, esses são os indivíduos classificados como LCR e geralmente evoluem para LC (Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998; Bacellar, Lessa *et al.*, 2002). A LC é caracterizada por uma lesão bem delimitada de bordas elevadas, com grande incidência de linfócitos, macrófagos e monócitos no infiltrado inflamatório (Follador, Araujo *et al.*, 1999; Unger, O'neal *et al.*, 2009).

Como este trabalho faz parte de uma coorte, a proposta do estudo é caracterizar fenotipicamente e funcionalmente as subpopulação de monócitos durante o acompanhamento clínico de todos os pacientes, assim como determinar a produção de citocinas (IL-12, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-17) e quimiocinas (CXCL-9, CXCL-10, CCL2, CCL-3, CCL-5) e seus receptores nas formas clínicas LCR e LC. Nesse sentido, também propomos determinar a contribuição destas subpopulações de monócitos em biópsias de pacientes com LC. Avaliar a produção de citocinas e quimiocinas na fase inicial da leishmaniose cutânea pode servir como biomarcador de evolução clínica e de resposta terapêutica ao antimonial.

X. CONCLUSÕES

A caracterização fenotípica sugere que a subpopulação de monócitos intermediários produtores de TNF, contribuem para a resposta inflamatória observada nos pacientes com leishmaniose cutânea tendo um importante papel na patogênese da doença.

XI. SUMMARY

Cutaneous leishmaniasis (CL) is an inflammatory parasitic disease characterized by the presence of ulcerated lesion on the skin. Patients with CL due to *Leishmania braziliensis* produce high levels of TNF, cytokine that contribute to tissue damage and ulcer development. Mononuclear cell infiltrate are found in lesions of CL patients, with presence of T and B lymphocytes, and mononuclear phagocytes. Most works have focused on T cells immune response and little attention has been given to the contribution of monocytes to the immunopathology observed in CL. Recently, three populations of monocytes have been described based on expression of CD14 and CD16: Classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺CD16⁺) and non-classical (CD14⁺CD16⁺⁺) monocytes. The objective of this study was to phenotypically and functionally characterizes monocyte subsets from CL patients. Peripheral blood mononuclear cells were obtained from healthy controls, CL patients in pre-ulcerative phase and CL patients with skin ulcer. Monocyte subsets characterization was performed by flow cytometry. We observed that the frequency of intermediate and non-classical monocyte populations was increased in individuals on pre-ulcerative phase and CL patients with skin ulcer. Expression of MHC class II was increased in intermediate monocytes, suggesting that these cells might better present antigen to T cells. Also, classical and intermediate monocytes produced more TNF than the non-classical ones in response to soluble *Leishmania* antigen and LPS. CCL2, a chemokine known to play important role in immune response against *Leishmania*. Interestingly, the frequency of CCL2 was significantly increase in peripheral blood from CL patients when compared to healthy controls, indicating that CCL2 expressing cells might migrate to the lesion site. Analysis of biopsies from CL patients showed that the predominant population of monocyte found in lesions of these individuals was the non-classical one. Altogether, our data show differences among monocyte subsets in CL. While classical and intermediate monocytes produce more TNF, non-classical ones are more frequent in lesions of these patients. The identification of cells that contribute to the immunopatology observed in CL will help to develop new forms of immunotherapy to this disease.

Keywords: leishmaniasis, immunopathology subsets monocytes

XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Aguilar-Ruiz, S. R., H. Torres-Aguilar, et al. Human CD16+ and CD16- monocyte subsets display unique effector properties in inflammatory conditions in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*, v.90, n.6, Dec, p.1119-31. 2011.

Alexander, J. e K. Bryson. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters*, v.99, n.1, Jun 15, p.17-23. 2005.

Alvar, J., S. Croft, et al. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, v.61, p.223-74. 2006.

Alvar, J., S. Yactayo, et al. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, v.22, n.12, Dec, p.552-7. 2006.

Ancuta, P., K. Y. Liu, et al. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC Genomics*, v.10, p.403. 2009.

Ancuta, P., R. Rao, et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, v.197, n.12, Jun 16, p.1701-7. 2003.

Antonelli, L. R., W. O. Dutra, et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology Letters*, v.101, n.2, Nov 15, p.226-30. 2005.

_____. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clinical & Experimental Immunology*, v.136, n.2, May, p.341-8. 2004.

Auffray, C., M. H. Sieweke, et al. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, v.27, p.669-92. 2009.

Bacellar, O., D. Faria, et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Infectious Disease*, v.200, n.1, Jul 1, p.75-8. 2009.

Bacellar, O., H. Lessa, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*, v.70, n.12, Dec, p.6734-40. 2002.

Barral, A., J. Guerreiro, et al. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.53, n.3, Sep, p.256-9. 1995.

- Barral, A., D. Pedral-Sampaio, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.44, n.5, May, p.536-46. 1991.
- Belge, K. U., F. Dayyani, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *The Journal of Immunology*, v.168, n.7, Apr 1, p.3536-42. 2002.
- Belkaid, Y., B. Butcher, et al. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *European Journal of Immunology*, v.28, n.4, Apr, p.1389-400. 1998.
- Bittencourt, A. L. e A. Barral. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.86, n.1, Jan-Mar, p.51-6. 1991.
- Boaventura, V. S., V. Cafe, et al. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.75, n.2, Aug, p.267-9. 2006.
- Carvalho, E. M., A. Barral, et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, v.56, n.4, Apr, p.315-25. 1994.
- Carvalho, E. M., W. D. Johnson, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v.135, n.6, Dec, p.4144-8. 1985.
- Castes, M., D. Trujillo, et al. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biological Research*, v.26, n.1-2, p.233-8. 1993.
- Chimma, P., C. Roussilhon, et al. A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathogenes*, v.5, n.10, Oct, p.e1000631. 2009.
- Cros, J., N. Cagnard, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, v.33, n.3, Sep 24, p.375-86. 2010.
- D'oliveira, A., Jr., P. Machado, et al. Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, n.1, Jan-Feb, p.7-10. 2002.

Da-Cruz, A. M., R. Bittar, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.9, n.2, Mar, p.251-6. 2002.

Da-Cruz, A. M., M. P. De Oliveira, et al. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.91, n.2, Mar-Apr, p.225-9. 1996.

Desjeux, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, v.14, n.5, Sep-Oct, p.417-23. 1996.

_____. Leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, n.9, Sep, p.692. 2004a.

_____. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology Infectious & Disease*, v.27, n.5, Sep, p.305-18. 2004b.

Faria, D. R., K. J. Gollob, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v.73, n.12, Dec, p.7853-9. 2005.

Follador, I., C. Araujo, et al. [Outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.32, n.5, Sep-Oct, p.497-503. 1999.

Frankenberger, M., T. Sternsdorf, et al. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*, v.87, n.1, Jan 1, p.373-7. 1996.

Gately, M. K., L. M. Renzetti, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual Review of Immunology*, v.16, p.495-521. 1998.

Gaze, S. T., W. O. Dutra, et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.63, n.1, Jan, p.70-8. 2006.

Geissmann, F., C. Auffray, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunology & Cell Biology*, v.86, n.5, Jul, p.398-408. 2008.

Geissmann, F., S. Jung, et al. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, v.19, n.1, Jul, p.71-82. 2003.

Giudice, A., C. Vendrame, et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infectious Disease*, v.12, p.75. 2012.

Gomes-Silva, A., R. De Cassia Bittar, et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clinical & Experimental Immunology*, v.149, n.3, Sep, p.440-4. 2007.

Goncalves, R., X. Zhang, et al. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v.208, n.6, Jun 6, p.1253-65. 2011.

Gorak, P. M., C. R. Engwerda, et al. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *European Journal of Immunology*, v.28, n.2, Feb, p.687-95. 1998.

Gordon, S. e P. R. Taylor. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, v.5, n.12, Dec, p.953-64. 2005.

Green, S. J., L. F. Scheller, et al. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunology Letters*, v.43, n.1-2, Dec, p.87-94. 1994.

Grimaldi, G., Jr. e R. B. Tesh. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, v.6, n.3, Jul, p.230-50. 1993.

Grimaldi, G., Jr., R. B. Tesh, et al. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American the Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.41, n.6, Dec, p.687-725. 1989.

Heine, G. H., C. Ulrich, et al. CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney International*, v.73, n.5, Mar, p.622-9. 2008.

Iwasaki, H. e K. Akashi. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*, v.26, n.6, Jun, p.726-40. 2007.

Jirmanus, L., M. J. Glesby, et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *American the Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.86, n.3, Mar, p.426-33. 2012.

Jones, T. C., W. D. Johnson, Jr., et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *The Journal of Infectious Diseases*, v.156, n.1, Jul, p.73-83. 1987.

Katayama, K., T. Matsubara, et al. CD14+CD16+ monocyte subpopulation in Kawasaki disease. *Clinical & Experimental Immunology*, v.121, n.3, Sep, p.566-70. 2000.

Landsman, L., L. Bar-On, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*, v.113, n.4, Jan 22, p.963-72. 2009.

Lessa, H. A., P. Machado, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *American the Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.65, n.2, Aug, p.87-9. 2001.

Liew, F. Y. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nature Reviews Immunology* v.2, n.1, Jan, p.55-60. 2002.

Liew, F. Y., C. Parkinson, et al. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology*, v.69, n.4, Apr, p.570-3. 1990.

Lindoso, J. A. e A. A. Lindoso. Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo*, v.51, n.5, Sep-Oct, p.247-53. 2009.

Machado, P., C. Araujo, et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clinical Infectious Disease*, v.34, n.12, Jun 15, p.E69-73. 2002.

Machado, P. R., M. E. Rosa, et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene*, v.105, n.8, Aug, p.438-44. 2011.

Marsden, P. D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene*, v.80, n.6, p.859-76. 1986.

_____. Endemic leishmaniasis in Brazil: future implications. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.89, n.3, Jul-Sep, p.425-6. 1994a.

_____. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Tres Bracos, Bahia-Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.27, n.2, Apr-Jun, p.93-101. 1994b.

Melby, P. C., F. J. Andrade-Narvaez, et al. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v.62, n.3, Mar, p.837-42. 1994.

Ministério da Saúde/SVS. <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/> 2009.

- Morgado, F. N., A. Schubach, et al. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *British Journal of Dermatology*, v.158, n.1, Jan, p.50-8. 2008.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, v.136, n.7, Apr 1, p.2348-57. 1986.
- Nathan, C. F. e J. B. Hibbs, Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology*, v.3, n.1, Feb, p.65-70. 1991.
- Nieves, E. e P. F. Pimenta. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, v.37, n.1, Jan, p.134-40. 2000.
- Oliveira, F., A. Bafica, et al. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *The American Journal the Tropical Medicine and Hygiene*, v.85, n.1, Jul, p.70-3. 2011.
- Passlick, B., D. Flieger, et al. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, v.74, n.7, Nov 15, p.2527-34. 1989.
- Pirmez, C., M. Yamamura, et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *The Journal of Clinical Investigation*, v.91, n.4, Apr, p.1390-5. 1993.
- Ribeiro-De-Jesus, A., R. P. Almeida, et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Reseach*, v.31, n.1, Jan, p.143-8. 1998.
- Rogacev, K. S., S. Seiler, et al. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *European Heart Journal*, v.32, n.1, Jan, p.84-92. 2010.
- Sacks, D. e N. Noben-Trauth. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*, v.2, n.11, Nov, p.845-58. 2002.
- Schriefer, A., A. L. Schriefer, et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v.72, n.1, Jan, p.508-14. 2004.

Scott, P., P. Natovitz, et al. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, v.168, n.5, Nov 1, p.1675-84. 1988.

Scott, P., E. Pearce, et al. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunological Reviews*, v.112, Dec, p.161-82. 1989.

Serbina, N. V., T. Jia, et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual Review Immunology*, v.26, p.421-52. 2008.

Serbina, N. V. e E. G. Pamer. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*, v.7, n.3, Mar, p.311-7. 2006.

Shweash, M., H. Adrienne Mcgachy, et al. Leishmania mexicana promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. *Molecular Immunology*, v.48, n.15-16, Sep, p.1800-8. 2011.

Strauss-Ayali, D., S. M. Conrad, et al. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of Leukocyte Biology*, v.82, n.2, Aug, p.244-52. 2007.

Tallone, T., G. Turconi, et al. Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, v.4, n.2, Apr, p.211-9. 2011.

Thieblemont, N., L. Weiss, et al. CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol*, v.25, n.12, Dec, p.3418-24. 1995.

Turetz, M. L., P. R. Machado, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *The Journal of Infectious Disease*, v.186, n.12, Dec 15, p.1829-34. 2002.

Unger, A., S. O'neal, et al. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.80, n.4, Apr, p.574-9. 2009.

Van Furth, R. e Z. A. Cohn. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, v.128, n.3, Sep 1, p.415-35. 1968.

Wong, K. L., J. J. Tai, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, v.118, n.5, Aug 4, p.e16-31. 2011.

Zawada, A. M., K. S. Rogacev, et al. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*, v.118, n.12, Sep 22, p.e50-61. 2011.

Zhao, C., H. Zhang, et al. Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods. *Journal of Proteome Research*, v.8, n.8, Aug, p.4028-38. 2009.

Ziegler-Heitbrock, H. W. Definition of human blood monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, v.67, n.5, May, p.603-6. 2000.

Ziegler-Heitbrock, L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, v.81, n.3, Mar, p.584-92. 2007.

Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, v.116, n.16, Oct 21, p.e74-80. 2010.

Zimmermann, H. W., S. Seidler, et al. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14⁺CD16⁺ monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One*, v.5, n.6, p.e11049. 2010.

ANEXIO I

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PACIENTES

Protocolo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo que avalia o papel de monócitos na patogênese da leishmaniose cutânea

Nome do Projeto:

“Participação de células fagocíticas na patogênese da leishmaniose cutânea”

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Médico, Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia.

Comitê de Ética: Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Rua Augusto Viana, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia. Tel.: (71) 3283.8140.

Nº do Projeto: _____

Convite e objetivo – Você é convidado a participar de um estudo que tem como objetivo entender as razões do desenvolvimento da leishmaniose cutânea. Além das informações aqui prestadas você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo será solicitado a assinar este termo de consentimento.

Participação Voluntária – A sua participação é voluntária. Você pode desistir de participar do estudo a qualquer momento, ou seja, agora ou durante a resposta ao questionário e ao exame físico. Você tem liberdade de se recusar a responder qualquer pergunta do questionário que considere invasão de privacidade, causadora de constrangimento e/ou desconforto moral. Caso depois de aceitar participar, resolva descontinuar a sua participação, este será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você

receberá todos os cuidados médicos dispensados aos pacientes com leishmaniose.

Finalidade – O objetivo deste estudo é encontrar marcadores que irão servir como preditores se você irá desenvolver lesão após você ser infectado pela *Leishmania*. Para tal nós analisaremos seu sangue, e material da lesão (caso você apresente uma) obtida através de um pequeno fragmento da sua pele.

Procedimento – Você será examinado por um médico e será feito um teste na pele de rotina. Nós iremos realizar procedimentos de rotina para definir o diagnóstico da leishmaniose, como biópsia ou aspirado da lesão com agulha ou aspirado do linfonodo. Caso você concorde em participar do estudo você doará de 30 ml a 60ml de sangue (cerca de 3 a 6 colheres de café). Nós usaremos esse sangue para realizar os testes, incluindo gravidez, açúcar no sangue, função renal, HIV, que irão esclarecer o mecanismo envolvido na sua defesa contra a *Leishmania*. Caso o seu teste de HIV seja positivo nós iremos direcionar você para um médico no departamento de doenças infecciosas no Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Ba. Em caso de não confirmado o diagnóstico de leishmaniose, nós iremos destruir qualquer amostra de sangue ou tecido que tenham sido coletadas para esta pesquisa. Os procedimentos seguintes são envolvidos neste estudo. **Coleta de sangue:** Nós iremos aplicar um garrote no seu braço e será feita limpeza da área com álcool. Usando uma agulha estéril e seringa, nós iremos coletar sangue de uma veia do seu braço. Após isso será solicitado para você se sentar até que o sangramento pare e tenhamos certeza de que você não tem nenhuma reação colateral. Isso é muito menos do que a Cruz Vermelha e os centros de Hematologia Brasileiros têm para a doação de sangue. **Biópsia da Lesão:** a biópsia do tecido será realizada no centro de uma lesão cutânea após anestesia.

Período do Estudo: Sua participação neste estudo começa com a coleta de sangue e biópsia da lesão, no caso de você ter uma. Após realização da coleta de sangue e biópsia, sua participação no estudo está terminada. Nós iremos pedir que você retorne a cada mês durante um ano como parte de seu acompanhamento. Essas visitas irão ajudar a determinar a cura ou a necessidade de um novo ciclo de tratamento com Glucantime ou outra droga, a qual também será dada sem custo para você. Isso não faz parte da pesquisa.

Confidencialidade – Qualquer informação obtida durante o estudo só será de conhecimento da equipe que participa do estudo e a organização que protege os indivíduos envolvidos em pesquisa (Escritório americano de proteção a seres humanos participantes em pesquisa). Os representantes do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) poderá ver os dados dos pacientes. Você e qualquer participante deste estudo não serão identificados por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análise dos Riscos e Benefícios: Coleta de sangue: riscos da coleta de sangue incluem hemorragia local e infecção. Biópsia da lesão: os riscos de biópsia da lesão são os mesmos da coleta de sangue e além destes uma cicatriz da biópsia. Os riscos de hemorragia ou infecção durante a biópsia da lesão ou coleta de sangue serão minimizados através da limpeza da pele ou membrana mucosa e da lesão com assepsia antes do procedimento, uso de instrumentos estéreis, e aplicação de pressão no local da lesão após a biópsia para parar sangramento. Perda potencial da confidencialidade pode ocorrer.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade – A leishmaniose é uma doença relacionada a reação do seu corpo contra a infecção pela *Leishmania*. O conhecimento das reações do seu corpo pode contribuir não somente pra a compreensão da doença, mas também para o desenvolvimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose. Entretanto, sua participação no estudo não trará nenhum benefício direto a você. O tratamento que você vai receber (Glucantime) é o mesmo tratamento recebido por qualquer paciente.

Custos – Você não terá nenhum custo com o tratamento com antimoniais ou qualquer outra droga contra a leishmaniose que seja necessária. Você não terá custos com a sua participação no estudo.

Esclarecimento – Caso você precise de esclarecimentos preliminares pode contar com os seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353: Dr Edgar M. Carvalho Filho, Dr. Paulo Machado ou Dr Luiz Henrique Guimarães. Se você tem qualquer pergunta sobre seus direitos como um sujeito da pesquisa, você pode contactar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (endereço no início deste consentimento informado), telefone número: 71-3203.2740.

Consentimento – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Assinatura do Participante Data Hora

Assinatura do Pesquisador Data Hora

Assinatura da Testemunha Data Hora

ANEXO II

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA MENORES DE 18 ANOS

Protocolo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo que avalia o papel de monócitos na patogênese da leishmaniose cutânea

Nome do Projeto:

“Participação de células fagocíticas na patogênese da leishmaniose cutânea”

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Médico, Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia.

Comitê de Ética: Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Rua Augusto Viana, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia. Tel.: (71) 3283.8140.

Nº do Projeto: _____

Convite e objetivo – Você é convidado a participar de um estudo que tem como objetivo entender as razões do desenvolvimento da leishmaniose cutânea. Além das informações aqui prestadas você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico.

Nós perguntaremos a você e seus responsáveis sobre sua saúde. Um médico irá fazer um exame físico em você, incluindo boca e nariz. Isso não irá machucar você. Então, nós iremos coletar sangue (cerca de 2 colheres de café) do seu braço usando uma agulha e uma seringa para fazer os testes que irão explicar a doença. Nós faremos um teste na sua pele, que será injetado uma pequena quantidade (duas gotas) no seu braço usando uma agulha. Se você tiver uma lesão na pele, vamos retirar um pequeno fragmento para diagnóstico. Isso será feito por um médico no posto de saúde, com anestesia local para você não sentir dor. Nós esperamos que durante o estudo possamos aprender mais sobre a doença, para poderemos preveni-la no futuro.

Você não precisa participar deste estudo. Se você quiser nos ajudar, por favor marque ou assine no local abaixo.

Sim, aceito participar do estudo.

Não aceito participar do estudo.

Assinatura do Participante Data Hora

Assinatura do Responsável pelo menor Data Hora

Assinatura da Testemunha Data Hora

Assinatura do Pesquisador Data Hora

ANEXO III

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA RESPONSÁVEIS / GUARDIÕES DE MENORES DE 18 ANOS

Protocolo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo que avalia o papel de monócitos na patogênese da leishmaniose cutânea

Nome do Projeto:

“Participação de células fagocíticas na patogênese da leishmaniose cutânea”

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Médico, Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia.

Comitê de Ética: Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Rua Augusto Viana, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia. Tel.: (71) 3283.8140.

Nº do Projeto: _____

Convite e objetivo – Sua criança é convidada a participar de um estudo que tem como objetivo entender as razões do desenvolvimento da leishmaniose cutânea. Além das informações aqui prestadas você pode perguntar tudo sobre o estudo ao médico. Caso sua criança decida participar do estudo será solicitado que este termo de consentimento para os responsáveis seja assinado.

Participação Voluntária – A participação da sua criança é voluntária. Sua criança pode desistir de participar do estudo a qualquer momento, ou seja, agora ou durante a resposta ao questionário e ao exame físico. Sua criança tem liberdade de se recusar a responder qualquer pergunta do questionário que considere invasão de privacidade, causadora de constrangimento e/ou desconforto moral. Se depois de aceitar participar, sua criança resolver descontinuar a participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para a

criança. Participando ou não do estudo a criança receberá todos os cuidados médicos dispensados aos pacientes com leishmaniose.

Finalidade – O objetivo deste estudo é encontrar marcadores que irão servir como preditores para saber se sua criança irá desenvolver lesão após ser infectada pela *Leishmania*. Para tal nós analisaremos o sangue e material da lesão (se a criança tiver uma lesão) obtida através de um pequeno fragmento da pele da criança.

Procedimento – A criança será examinada por um médico e será feito um teste na pele de rotina. Nós iremos realizar procedimentos de rotina para definir o diagnóstico da leishmaniose, como biópsia ou aspirado da lesão com agulha ou aspirado do linfonodo se a criança tiver uma lesão na pele ou linfonodo aumentado. Caso a criança concorde em participar do estudo ela doará de 30 ml a 60ml de sangue (cerca de 3 a 6 colheres de café). Nós usaremos esse sangue para realizar os testes, incluindo gravidez, açúcar no sangue, função renal, HIV, que irão esclarecer o mecanismo envolvido na defesa de sua

criança contra a *Leishmania*. Caso o teste de HIV seja positivo nós iremos lhe encaminhar com a criança para um médico no departamento de doenças infecciosas no Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Ba. Em caso de não confirmado o diagnóstico de leishmaniose, nós iremos destruir qualquer amostra de sangue ou tecido que tenham sido coletadas para esta pesquisa. Os procedimentos seguintes são envolvidos neste estudo. **Coleta de sangue:** Nós iremos aplicar um garrote no seu braço e será feita limpeza da área com álcool. Usando uma agulha estéril e seringa, nós iremos coletar sangue de uma veia do seu braço. Após isso será solicitado para você se sentar até que o sangramento pare e tenhamos certeza de que você não tem nenhuma reação colateral. Esta quantidade é muito menor do que a Cruz Vermelha e os centros de Hematologia Brasileiros têm para a doação de sangue. **Biópsia da Lesão:** Se a criança tiver uma lesão na pele a biópsia do tecido será realizada na borda da lesão após anestesia local para evitar dor.

Período do Estudo: A participação da criança neste estudo começa com a coleta de sangue e biópsia da lesão, se a criança tiver uma. Após realização da coleta de sangue e biópsia, a participação da criança no estudo está terminada. Nós iremos pedir que a criança retorne a cada mês durante um ano como parte de seu acompanhamento. Essas visitas irão ajudar a determinar a cura ou a necessidade de um novo ciclo de tratamento com Glucantime ou outra droga, a qual também será dada sem custo para criança. Isso não faz parte da pesquisa.

Confidencialidade – Qualquer informação obtida durante o estudo só será de conhecimento da equipe que participa do estudo e a organização que protege os indivíduos envolvidos em pesquisa (Escritório americano de proteção a seres humanos participantes em pesquisa). Os representantes do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) poderá ver os dados dos pacientes. A criança e qualquer participante deste estudo não serão identificados por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análise dos Riscos e Benefícios: Coleta de sangue: riscos da coleta de sangue incluem hemorragia local e infecção. Biópsia da lesão: os riscos de biópsia da lesão são os mesmos da coleta de sangue e além destes uma cicatriz da biópsia. Os riscos de hemorragia ou infecção durante a biópsia da lesão ou coleta de sangue serão minimizados através da limpeza da pele e da lesão com assepsia antes do procedimento, uso de instrumentos estéreis, e

aplicação de pressão no local da lesão para parar o sangramento. Perda potencial da confidencialidade pode ocorrer.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade – A leishmaniose é uma doença relacionada a reação do seu corpo contra a infecção pela *Leishmania*. O conhecimento das reações do seu corpo pode contribuir não somente pra a compreensão da doença, mas também para o desenvolvimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose. Entretanto, a participação da criança no estudo não trará nenhum benefício direto a você. O tratamento que criança vai receber (Glucantime) é o mesmo tratamento recebido por qualquer paciente.

Custos – A criança não terá nenhum custo com o tratamento com antimoniais ou qualquer outra droga contra a leishmaniose que seja necessária. A criança não terá custos com a participação no estudo.

Esclarecimento – Caso você ou sua criança precise de esclarecimentos preliminares pode contar com os seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353: Dr Edgar M. Carvalho Filho, Dr. Paulo Machado ou Dr Luiz Henrique Guimarães.

Se você tem qualquer pergunta sobre seus direitos de sua criança como um sujeito da pesquisa, você pode contactar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (endereço no início deste consentimento informado), telefone número: 71-3203.2740.

Consentimento – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Assinatura do Responsável Data Hora

Assinatura do Pesquisador Data Hora

Assinatura da Testemunha Data Hora

ANEXO IV

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA CONTROLES SADIOS

Protocolo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo que avalia o papel de monócitos na patogênese da leishmaniose cutânea

Nome do Projeto:

“Participação de células fagocíticas na patogênese da leishmaniose cutânea”

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Médico, Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia.

Comitê de Ética: Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Rua Augusto Viana, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia. Tel.: (71) 3283.8140.

Nº do Projeto: _____

Convite e objetivo – Você é convidado a participar de um estudo que tem como objetivo entender as razões do desenvolvimento da leishmaniose cutânea. Além das informações aqui prestadas você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo será solicitado a assinar este termo de consentimento.

Participação Voluntária – A sua participação é voluntária. Você pode desistir de participar do estudo a qualquer momento.

Finalidade – O objetivo deste estudo é encontrar marcadores que irão servir como preditores se indivíduos infectados pela *Leishmania* irão desenvolver lesão. Para tal nós analisaremos seu sangue e comparar com o obtido de pessoas com leishmaniose.

Procedimento – Caso aceite participar do estudo, solicitaremos a doação de 60 ml do seu sangue (entre 3 a 6 colheres de sopa). Os seguintes procedimentos estão envolvidos neste estudo. **Coleta de sangue:** Nós iremos aplicar um garrote no seu braço e será feita limpeza da área com álcool.

Usando uma agulha estéril e seringa, nós iremos coletar sangue de uma veia do seu braço. Após isso será solicitado para você continuar sentado até que o sangramento pare e tenhamos certeza de que você não tem nenhuma reação colateral. Isso é muito menos do que a Cruz Vermelha e os centros de Hematologia Brasileiros têm para a doação de sangue.

Período do Estudo: Sua participação neste estudo começa com a coleta de sangue. Após a coleta de sangue sua participação neste estudo terá terminado.

Confidencialidade – Qualquer informação obtida durante o estudo só será de conhecimento da equipe que participa do estudo e a organização que protege os indivíduos envolvidos em pesquisa (Escritório americano de proteção a seres humanos participantes em pesquisa). Os representantes do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) poderá ver os dados dos pacientes. Você e qualquer participante deste estudo não serão identificados por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análise dos Riscos e Benefícios: Coleta de sangue: riscos da coleta de sangue incluem hemorragia local, infecção e vertigens ou desmaios. Os riscos de hemorragia ou infecção durante a coleta de sangue serão minimizados através da limpeza da pele com antisséptico antes do procedimento, uso de instrumentos estéreis, e aplicação de pressão no local da lesão após a biópsia para parar sangramento.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade – A leishmaniose é uma doença relacionada a reação do corpo contra a infecção pela *Leishmania*. O conhecimento das reações do corpo pode contribuir não somente pra a compreensão da doença, mas também para o desenvolvimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose. Entretanto, sua participação no estudo não trará nenhum benefício direto a você.

Custos – Você não terá nenhum custo e não receberá pagamento pela sua participação no estudo.

Esclarecimento – Caso você precise de esclarecimentos sobre o estudo ou precise de atendimento médico, você pode contar com os seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho Filho, Dr. Paulo Machado ou Dr. Luiz Henrique Guimarães.

Se você tiver qualquer pergunta sobre seus direitos como um sujeito da pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética do Hospital Universitário

Professor Edgard Santos (endereço no início deste consentimento informado),
número de telefone: 71-3203.2740.

Consentimento – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste formulário será entregue para você guardar.

Assinatura do Participante Data Hora

Assinatura do Pesquisador Data Hora

Assinatura da Testemunha Data Hora

ANEXO V

Normas para elaboração de artigo da revista *The Journal of Immunology*



Manuscript Preparation

General Guidelines

A 12-point serif font, preferably Times New Roman, is required. Do not use compressed type format. Double-space entire manuscript. Each of the following components should begin on a separate page:

The *Title Page* must include the full title; a running title (not to exceed 60 characters); each author's full name as it should be published (first name, middle initial, last name) and the affiliations of all authors and their institutions, departments, or organizations (use the following symbols in this order to designate authors' affiliations: *, †, ‡, §, ¶, ||, #, **, ††, ‡‡, §§, ¶¶, || ||, ##). List the phone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author on the title page. (See the [Submit Online](#) section for information about the corresponding author designation during submission and peer review.)

The *Abstract* must be 250 words or less for Full-Length type manuscripts. Reference citations should not be included in the *Abstract*. The species of animals or species of origin of cells used in the manuscript must be clearly stated in the *Abstract*. Please ensure that the final few sentences (50 words or less) of the *Abstract* provide a succinct summary of the main point of the paper.

The *Introduction*, *Materials and Methods*, *Results*, and *Discussion* sections should begin on separate pages in that order. Do not combine the *Results* and *Discussion* sections for Full-Length papers.

For flow cytometry experiments, authors should specify the gating strategies in the *Methods* or in the figure legend.

Authors are encouraged to include the Minimal Information About T cell Assays ([MIATA](#)) in the *Methods*, the figure legend or elsewhere as appropriate.

Acknowledgments appear immediately after the *Discussion* and before *References*. *Grant support* must NOT be included in the *Acknowledgments* but should be cited as a footnote to the title. All funding sources must be disclosed and will be published as a footnote to the title; anonymous or pseudonymous funders are not permitted.

References must be numbered as they appear in the text. All authors must be listed for each reference. If citations are included in tables or in figure legends, they must

be numbered according to the position of citation of the table or figure in the text. Only published papers and papers in press may be included in the *References*. In press articles, i.e., papers not yet published, must be submitted as online attachments in PDF format at the time of article submission. NOTE: Do NOT submit as attachment papers that are already published, e.g., manuscripts published ahead of print. Such papers must be incorporated into the *References* and cited with their DOI numbers and year of publication. Citations of "manuscripts in preparation," "unpublished observations," and "personal communications" must appear parenthetically in the text. Manuscripts "submitted for publication" (i.e., not yet accepted) also are mentioned parenthetically in the text. Written approval by the persons cited in personal communications must accompany the manuscript unless they are also authors of the manuscript submitted to *The JI*.

1. Format for references:

Periodicals: Wells, A. D., M. C. Walsh, D. Sankaran, and L. A. Turka. 2000. T cell effector function and anergy avoidance are quantitatively linked to cell division. *J. Immunol.* 165: 2432–2443.

Books: McIntyre, T. M., and W. Strober. 1999. Gut-associated lymphoid tissue: regulation of IgA B-cell development. In *Mucosal Immunology*, 2nd ed. P. L. Ogra, J. Mestecky, E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, and J. R. McGhee, eds. Academic Press, San Diego, CA. p. 319–356.

Articles published ahead of print: Fraser, D.A., A. K. Laust, E. L. Nelson, and A. J. Tenner. 2009. C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *J. Immunol.* doi:10.4049/jimmunol.0902232.

Footnotes should be used to designate the source of support, new or special abbreviations used, correspondence address, current address, etc. Footnotes should be numbered consecutively and will appear on the title page, but for submission are grouped together and placed on a separate page between the *References* and the *Figure Legends*.

Abbreviations that may be used without definition are provided below. Spell out nonstandard abbreviations used less than three times. Nonstandard abbreviations used three or more times must be defined in a footnote. Abbreviations and their definitions must be consistent throughout the text.

The abbreviations listed below are used without definition in articles published in *The JI*. The form may be used for both singular and plural, or made plural with "s" at the author's option. The list of standard abbreviations is published in the first issue of each volume.

Tables must be numbered with Roman numerals in order of appearance in the text. All tables must have a title. Table legends are prepared as footnotes to the table

and are included with the table. Tables must be in DOC file format. Each table should be submitted as a separate file.

Figure legends must be numbered with Arabic numerals in order of appearance in the text and should include a short title after the figure number. Where possible, symbols and patterns used to distinguish data should be defined in a key placed within the graphic rather than in the figure legend. All figure legends must specify the number of times each experiment was independently performed, as well as the number of animals or replicates in each experimental group. For flow cytometry experiments, authors should specify the gating strategies in the *Methods* or in the figure legend.

Figures: At initial submission, please submit low resolution files of the smallest possible file size that will convey the needed information. Smaller files can be downloaded more quickly by reviewers and will hasten the review process. Alternately, single PDF of text plus figures may be submitted at initial submission. At submission of a revised manuscript, high-resolution figures that meet the following specifications must be submitted. For more information, see [GUIDELINES](#) and [TIPS](#).

Color: Color figures must be in the RGB color space.

File Sizes: Figure files should not exceed 10 MB (average size is about 2 MB).

Image Sizes: Figures should be submitted in final print publication size (printed 1:1). Figures may be published in print in one of two formats: single-column (width from 3.37 to 8.23 cm) or double-column (width from 12.65 to 17.1 cm). The single-column format is preferred. Unless the file size is too large, multi-panel figures should be submitted as a single file.

Text and Lines: Text in figures must be 6-8 points in size, except for single letter markers, which may be 12 points. Helvetica or Arial should be used for all figure text (except for the use of symbols). Line widths must be greater than one point thick or they will not be visible on the PDF version of the article.

Numbering: Figures must be numbered as they appear in the text.

File Format: Figures should be in **TIFF** (better for halftone art e.g., blots, photographs) **EPS** (better for line art or monochrome art, i.e., anything that involves sharply delineated lines), or **PDF** format. PowerPoint files are not suitable quality, as their resolution is too low for print. Please click [here](#) for detailed instructions on converting PowerPoint files to TIFF files.

Digital Images: All images submitted to *The Journal of Immunology* must accurately represent the original data. Original data (digital files, autoradiographs, films, etc.) for all experiments should be fully annotated, secured, and retrievable. The *original* image file (raw data file) should be kept in an unprocessed and non-

compressed file *format*. Figures that are compiled into multi-figure panels should be kept individually.

Although manipulation of images should be kept to an absolute minimum, there are some circumstances when manipulations are necessary. If, however, the quality of an image is too poor to clearly convey the conclusion, the experiment should be repeated.

Collecting images: If multiple images are compared to one another, collect each image in the same manner. Any post-collection processing should be applied in a uniform manner to all images. If differences in collection/post-collection are necessary, these need to be described in the legend or methods section.

Brightness and Contrast: If the brightness or contrast of an image needs minor adjustment, adjustments must be applied to the **entire** image and must not obscure or eliminate any information. Significant adjustments are not recommended. Always note any adjustment in the legend or methods section.

Cloning Tools: Images should not be “airbrushed” (with Clone Stamp Tool/Clone Brush) to remove “blemishes”. Do not use cloning tools to insert something into an image from elsewhere.

Gels/Blots: All gels should contain a positive and a negative control, and a set of molecular weight markers. For Western blots, control panels (actin, GAPDH, etc.) should come from a stripped and re-probed membrane of the experimental blot shown. If this is not possible, the control blots should be derived from the same samples and this should be indicated in the figure legend.

Cropping: Conservative cropping of gels and blots to improve clarity and conciseness may be permitted if the following points are observed:

important bands must be retained

at least several band widths should be retained above and below the cropped band

cropping must be noted in the legend

band(s) of interest must be clearly labeled

molecular weight marker positions should be shown in all gels/blots

Splicing: Occasionally, images are spliced to rearrange the order of samples for the sake of presentation, such as those in a Western blot. If splicing of data from a single experiment is necessary, draw contrasting (black or white) lines to indicate where the images were joined and state the manipulation in the legend. It would be preferable to re-run the gel so that the order is correct. Images from different experiments should not be spliced to form a new single image.

Cover Art: Cover art is selected from images in accepted articles and changes with each issue of *The JI*. Authors are encouraged to submit color figures with their manuscripts for possible use as cover illustrations. If an image is selected as cover art, the file must have a resolution of at least 300 dpi at a size of 8.5" x 11".

Depositing In Public Databases

High-resolution structural data: Any paper submitted to *The JI* that contains new high-resolution structural data requires an accession number from the [Protein Data Bank](#) and assurance that unrestricted release will occur at or before the time of publication. The accession number should be accompanied by the Website address of the databank.

Nucleotide sequences: Sequences of nucleotides or amino acids longer than 50 bases/residues should not be presented in the text or in table form, but rather should be submitted as a publication-quality figure. Original nucleotide sequences, and determined nucleotide sequences encoding reported amino acid sequences, described in the manuscript must be submitted to [GenBank](#) or [EMBL DataLibrary](#) at the time of manuscript submission. An accession number and sequence availability are required at the time of publication. The accession number should be accompanied by the Website address of the databank.

Microarray Data: *The JI* will not publish descriptive manuscripts that report microarray data, unless such information can be considered of unusual immunological significance and/or include functional experiments that provide novel insight into mechanism. As with other scientific approaches, current experimental, quantitation, verification, and statistical analyses are expected. Microarray experiments should be Minimum Information About a Microarray Experiment ([MIAME](#)) compliant. Whereas limited online space may be available for supplemental tables associated with the manuscript, complete microarray data must be deposited in the appropriate public database (e.g., [GEO](#), [ArrayExpress](#), or [CIBEX](#)), and must be accessible without restriction from the date of publication. An entry name or accession number must be included in the paper before publication. The accession number should be accompanied by the Website address of the databank.

Estimating Manuscript Length: One printed page in *The JI* contains approximately 8,000 characters, including spaces. Thus, an 8 page, Full-Length article would contain approximately 64,000 characters. Each line in a table occupies about 60 characters for a single-column table (120 characters for a double-column table). Figures occupy about 180 characters per centimeter height for single-column figures (360 characters for double-column figures). Determine the total character count for the text of your manuscript and add the character-equivalents for the tables and figures. This will provide a reasonable estimate for the printed length of a manuscript.

Human And Animal Use: All studies involving human subjects must be conducted in accordance with the guidelines of the World Medical Association's Declaration of Helsinki (most recent revision). All animal studies must be performed in compliance with the U.S. Department of Health and Human Services Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (or otherwise equivalent guidelines). A statement that human and/or animal studies have been reviewed and approved by an appropriate institutional review committee must be included in the *Materials and Methods* section of the manuscript.

Style Guide

General style conventions: In general, *The JI* follows *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, seventh edition, published by the Council of Science Editors, Inc., in instances where style issues are not directly addressed.

Abbreviations for references: [PubMed](#) is the primary source for journal name abbreviations.

Nomenclature:

1. **Allergen nomenclature:** Nomenclature for allergens should be assigned in cooperation with the IUIS Allergen Sub-Committee. Authors of accepted manuscripts that describe novel allergens will be requested to complete a brief standard form available at [IUIS Allergen Nomenclature](#).

2. *CD nomenclature*: For the purpose of consistency, *The JI* will follow CD nomenclature. For murine molecules, *The JI* will follow the nomenclature previously published ([J. Immunol. 160: 3861-3868, 1998](#)). For human molecules, standard CD nomenclature will be followed as updated ([J. Immunol. 168: 2083-2086, 2002](#)). See also [HCDM](#)
3. *Chemical names*: The JI uses [The Merck Index](#) and the [IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature-Chemical Abstracts](#) as the primary references for proper spelling and style of chemical names.
4. *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*: The systematic name for chemokines and chemokine receptors should be used. The original name may be given in parenthesis if desired. See *Cytokine 21:48-9, 2003*.
5. [Enzyme Nomenclature](#) is *The JI* source for style and spelling of enzyme names.
6. *Gene nomenclature*: The [HUGO guidelines](#) for gene nomenclature may be used for naming human genes. [Mouse Genome Informatics](#) is a reference source for naming mouse genes.
7. *Genetic nomenclature for mice*: *The JI* uses the revisions for standardized genetic nomenclature for mice published periodically in *Mouse Genome*. A current listing of inbred strains of mice and rats is available at [Mouse Genome Informatics](#). Authors are encouraged to deposit their mapping data with the Mouse Genome Database (MGD) before publication and to include the assigned MGD accession numbers in their manuscripts. Data may be submitted electronically by e-mail. Information about electronic submission of datasets can be obtained at the [Data and Nomenclature Submissions](#) page. Gene symbols should be reserved with MGD in advance of publication. An [electronic nomenclature submission form](#) is available from the MGD Web site.
8. *HLA nomenclature*: HLA nomenclature is updated periodically by the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. A recent reference is *Hum. Immunol. 64: 919-20, 2003*. Annual comprehensive revisions are published in *Human Immunology*, usually in the spring. See also: [EMBL-EBI](#)

Supplemental Materials

Supplemental Data:

Supporting data that are not essential to understanding the material presented in the manuscript may be submitted with the original paper for peer review; however, the print version of the paper must stand on its own without the Supplemental Data. Supplemental material is primarily intended for short videos or large tables, large sequence alignments, or large data sets. Additional supplemental figures and tables that support the interpretation and conclusions drawn in the manuscript may, however, also be submitted for review with the manuscript.

Supplemental Data must be submitted as separate files from the rest of the manuscript during the online submission; select "Supplemental Data" as the "File Type" when uploading the files.

For Cutting Edge manuscripts, no more than two supplemental figures and/or tables may be submitted; for Full-Length manuscripts, no more than four supplemental figures and/or tables may be submitted.

Legends or short explanations must accompany all supplemental figures; no other supplementary text is permitted.

Videos must be 320 x 480 pixels or smaller for best viewing within a browser. Videos must be no longer than 30 seconds and under 10 MB, with no sound or voice-over. Submit videos in MPG or QuickTime format. Change QuickTime file extensions to ".mov" so that Web browsers will recognize the file type and play the movie. Compress videos as much as possible to help control file size. Name videos by order of citation appearance (e.g., video1.mov). Select "Video" as the "File Type" when uploading the files during online submission. Authors will be notified if problems exist with videos as submitted and will be asked to take responsibility for modifications. No editing will be done to videos at the Editorial Office.

Links to the Supplemental Material will appear in two places in the online journal: in the Table of Contents and in the information box associated with the first page of the full-text article. There will not be any links in the body of the article. In the printed paper, supplemental material will be footnoted the first time mentioned: "The online version of this article contains supplemental material."

Supplemental Materials are posted online as provided by the author.

There is a publication charge of \$75 per supplemental figure or table.

Web Links In Submitted Manuscripts: Links to Websites are permitted only if the information contained on the Website is not essential to the understanding and assessment of the manuscript or to the ability to repeat the experiments described in the paper. Web links will not be checked after submission for correctness or functionality; it is the responsibility of the authors to ensure that the web link is correct.

Cutting Edge Manuscripts

Manuscripts submitted to the Cutting Edge section should conform to the [General Guidelines](#) for Full-Length manuscripts as well as the additional guidelines below:

Cutting Edge articles, including figures and references, *must fit within 4 journal pages*. See [Estimating Manuscript Length](#) for how to estimate the size of figures and tables and limit the text accordingly. One printed page in *The JI* contains approximately 8,000 characters, including spaces. Thus, a 4-page Cutting Edge article would contain approximately 32,000 characters.

The *Abstract* is limited to 150 words.

The *Materials and Methods* section may be sharply limited but should be sufficient to allow the evaluation of results and conclusions.

Authors may combine the *Results* and *Discussion* sections.