

AValiação DO PAPEL DOS DIFERENTES ISOLADOS DE *Leishmania braziliensis* E DOS MONÓCITOS NA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE DISSEMINADA

I. RESUMO

Introdução: A Leishmaniose Disseminada (LD) causada por *Leishmania braziliensis*, é caracterizada pela presença de 10 ou mais lesões papulares, acneiformes e ulceradas. Alguns estudos têm mostrado que *L. braziliensis* isoladas de pacientes com LD, leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) são polimórficas, apresentando uma diversidade genética que está associada com as formas clínicas na leishmaniose tegumentar americana (LTA). O antígeno solúvel obtido de isolados de *L. braziliensis* de pacientes LD induz uma resposta inflamatória maior quando comparado com antígeno obtido de isolados de pacientes com LC em células de pacientes com LC e LD. Estudos têm mostrado que monócitos/macrófagos de pacientes com LC e LM comportam-se de maneira diferente frente à infecção com *L. braziliensis* quando comparado com células de controles sadios (CS). Ainda não existem estudos sobre o comportamento dos monócitos na LD. **Objetivo:** Avaliar o papel de monócitos e de isolados de *Leishmania braziliensis* genotipicamente diferentes na resposta inflamatória observada na leishmaniose disseminada. **Métodos:** Monócitos de pacientes com LD (n=12), LC (n=12) e de CS (n=5) foram infectados com isolados de *L. braziliensis* de pacientes com LD e isolados de pacientes com LC na proporção de 5:1. A avaliação do grau de infecção e da carga parasitária foi avaliada através da contagem de preparações de *cytopspin* por microscopia óptica. Para a análise da sobrevivência dos diferentes isolados de *L. braziliensis* em monócitos de pacientes com LC, LD e CS foi realizada a contagem de promastigotas viáveis no sobrenadante de culturas utilizando a técnica de microscopia óptica. A avaliação da produção dos radicais oxidativos foi realizada pela oxidação da Dihidrorodamina 123 (DHR-123) e analisada através da citometria de fluxo. A expressão de TLRs e de citocinas/quimiocinas foi avaliada através de citometria de fluxo. **Resultados:** A frequência de monócitos de pacientes com LD infectados com isolado de LD e a carga parasitária foi maior do que a observada em monócitos infectados com o isolado LC após 48 horas de infecção. O mesmo foi observado nas células de pacientes com LC. O número de promastigotas viáveis no sobrenadante de monócitos infectado com o isolado LD foi maior quando comparado com o isolado LC em ambos os grupos. O mesmo foi observado em monócitos de CS. A produção de burst oxidativo pelos monócitos de LD, LC e CS infectados com isolado LD foi maior quando comparada a isolado de LC. A expressão de TLR2 foi maior em monócitos LD após infecção com isolado LD quando comparado com isolado LC. A produção de CXCL9 em monócitos de LD foi maior após a infecção com o isolado de LD quando comparado com o isolado LC. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que as diferenças genóticas da *L. braziliensis* que causa LD e LC podem influenciar o comportamento desse parasito nos monócitos humanos e contribuir para a patogênese da doença.

Palavras chaves: Isolados de *L. braziliensis*; Leishmaniose Disseminada.

EVALUATION OF THE ROLE OF THE DIFFERENT ISOLATES OF *Leishmania braziliensis* AND MONOCYTES IN LEISHMANIASIS PATHOGENESIS DISSEMINATED

II. SUMMARY

Introduction: Disseminated Leishmaniasis (DL) caused by *Leishmania braziliensis* is characterized by the presence of 10 or more papular, acneiform and ulcerated lesions. Some studies have shown that evidence of polymorphism of leishmania parasites and *L.braziliensis* isolated from patients with DL, cutaneous leishmaniasis (CL) and mucosal leishmaniasis (ML) are polymorphic, presenting a genetic diversity that is associated with clinical forms of ATL. The soluble antigen obtained from *L.braziliensis* isolates from DL patients induced a greater inflammatory response when compared to antigen obtained from isolates of patients with CL in cells of patients with CL and DL. Studies have shown that monocytes / macrophages from patients with CL and ML behave differently against infection with *L.braziliensis* when compared to cells from healthy controls (HS). There are no studies about the behavior of monocytes in DL. **Objective:** To evaluate the role of monocytes and isolates of *Leishmania braziliensis* genotypically different in the inflammatory response in DL. **Methods:** Monocytes from patients with DL (n=12) and from patients with CL (n=12) were infected with *L. braziliensis* isolates from patients with DL and isolated from patients with CL at a ratio of 5:1. The evaluation of the degree of infection and the parasite load was evaluated after cytopspin preparations by optical microscopy. To analyze the survival of different *L. braziliensis* isolates in monocytes from DL and CL patients, the number of viable promastigotes was quantified on the culture supernatant by optical microscopy. The evaluation of oxidative radical production was performed by oxidation of Dihydrorhodamine 123 (DHR-123) and analyzed by flow cytometry. Expression of TLRs and cytokines / chemokines was assessed by flow cytometry. **Results:** The monocyte frequency of DL patients infected with DL isolate and parasite load was higher than that observed in monocytes infected with the CL isolate after 48 hours of infection. The same was observed in the cells of patients with CL. The number of viable promastigotes in the monocyte supernatant infected with the DL isolate was higher when compared to the CL isolate in both groups. The same was observed in CL monocytes. Oxidative burst production by DL monocytes and CL monocytes infected with DL isolate was higher when compared to CL isolates in DL monocytes and CL monocytes. TLR2 expression was higher in DL monocytes after infection with DL isolate when compared to CL isolate. The production of CXCL9 was higher after infection with the DL isolate when compared to the CL isolate.

Conclusions: These results suggest that the genotypic differences of *L.braziliensis* causing DL and CL can influence the behavior of this parasite in human monocytes and contribute to the pathogenesis of the disease.

Keywords: isolated from *Leishmania braziliensis*; Disseminated leishmaniasis;

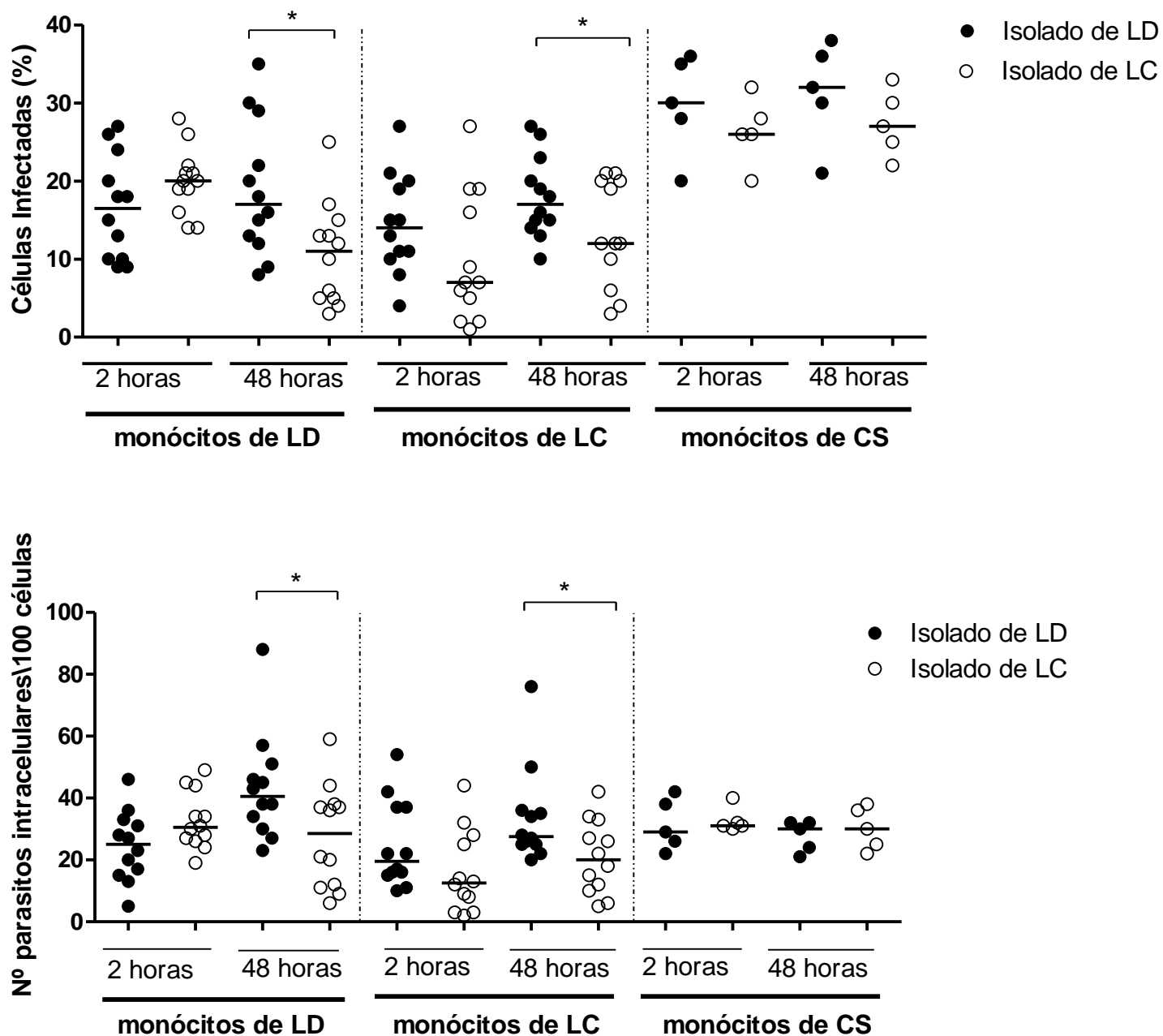


Figura 1- Avaliação da infecção e da carga parasitária de monócitos após a exposição por diferentes isolados de *L. braziliensis*: Os monócitos de pacientes com LD (n=12), LC (n=12) e CS (n=5) foram infectados com diferentes isolados de *L. braziliensis* na proporção de 5:1 nos períodos de duas e 48 horas de infecção. A figura A representa o número de células infectadas. A figura B representa a carga parasitária, obtida através da contagem de parasitas intracelulares, As lâminas foram coradas com Giemsa e a avaliação da infecção dos monócitos foi realizada através da microscopia óptica. Os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney. (**p*<0.05).

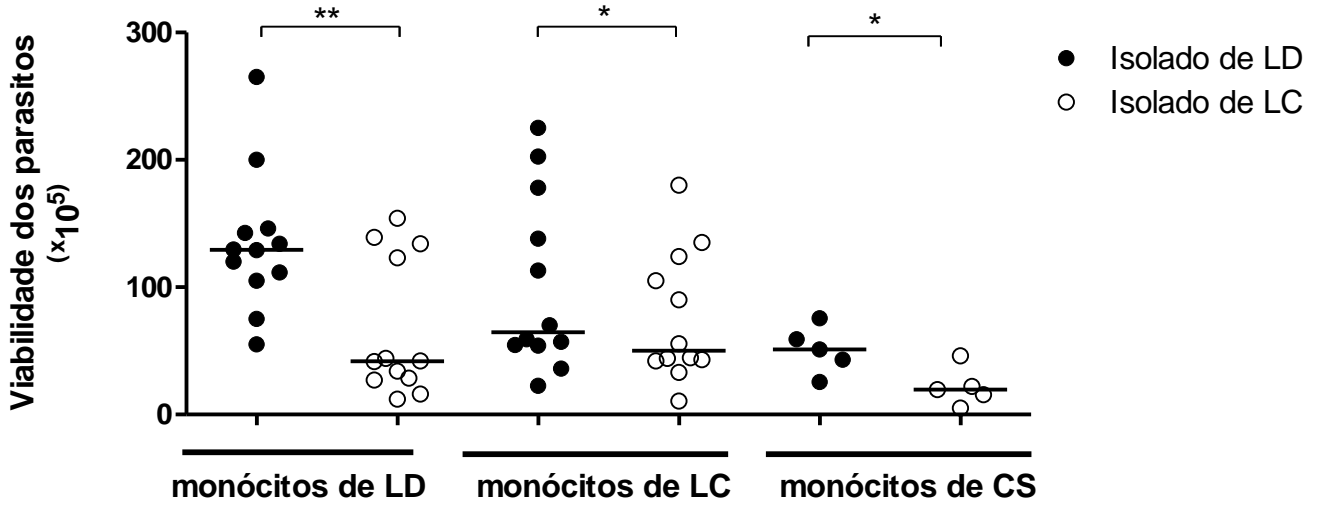


Figura 2- Viabilidade das promastigotas extracelulares nos monócitos de pacientes com LD e LC após infecção dos diferentes isolados de *L. braziliensis*: Os monócitos de pacientes com LD (n=12), LC (n=12) e CS (n=5) foram infectados com os diferentes isolados de *L. braziliensis* por 48 horas. Após esse período o meio RPMI foi substituído pelo meio de cultura Schneider por mais 48 horas. O número de promastigotas viáveis nas culturas foi avaliado através da técnica de microscopia óptica. O teste estatístico utilizado foi o teste de Wilcoxon e os valores estão expressos em mediana. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney. *p<0.05 **p<0.01.

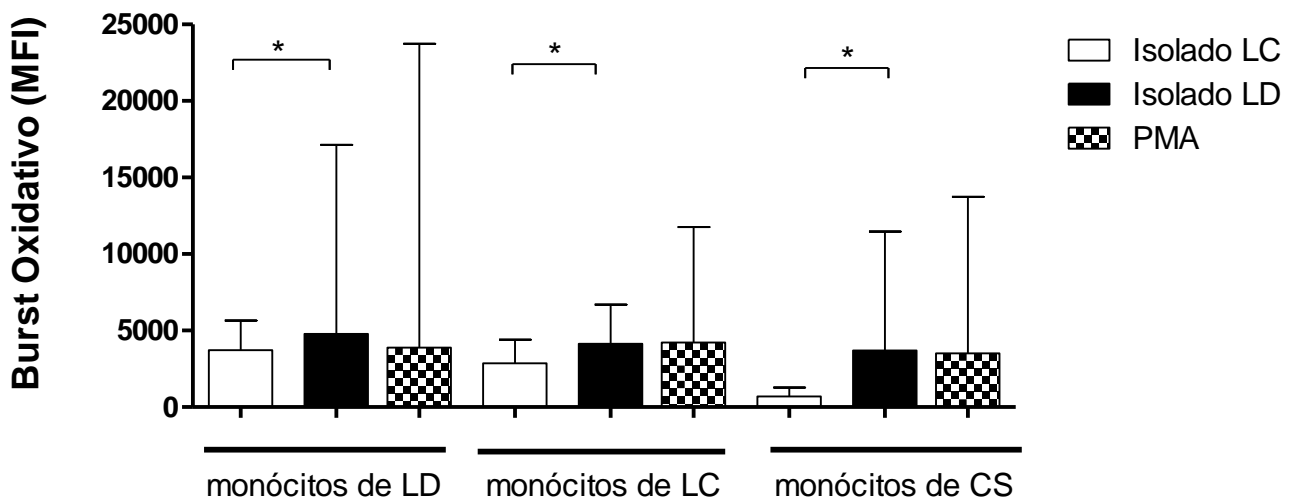


Figura 3- Expressão do *burst* oxidativo por monócitos de pacientes com leishmaniose disseminada e monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea: Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD (n=12), LC (n=12) e CS (n=5) foram marcados com anti-CD14. O DHR foi utilizado para avaliar a expressão do *burst* oxidativo pelos monócitos após a infecção por *L. braziliensis* através da técnica de citometria de fluxo e a análise foi feita através do programa FlowJo (Figura A). Os dados estão representados em mediana da média de intensidade de fluorescência da expressão de DHR nos monócitos de pacientes com LD e LC (Figura B). Como controle positivo foi utilizado o PMA. Todos os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney. *p<0.05 **p<0.01.

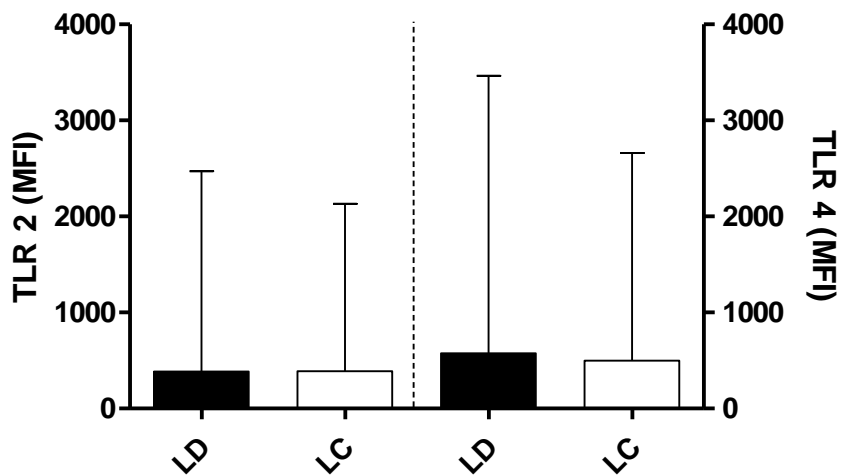
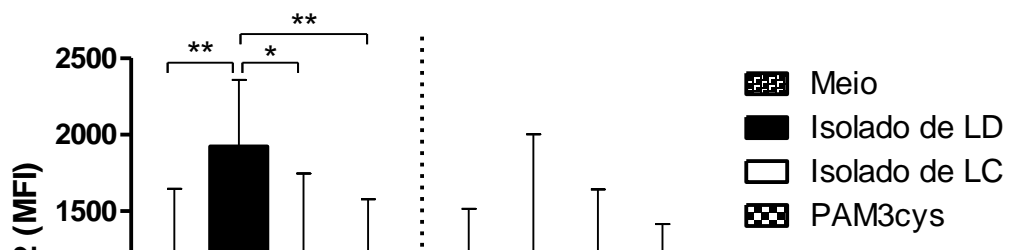


Figura 4- Expressão *ex vivo* de TLR2 e TLR4 nos monócitos de pacientes com LD e LC: Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD (n=12) e LC (n=12) foram marcados com anticorpos anti-CD14 para a identificação dos monócitos e em seguida com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4. Os dados foram coletados usando citometria de fluxo e analisados usando o software FLOWJO. A expressão *ex vivo* de TLR2 e TLR4 foi avaliada em células CD14+. Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Mann Whitney.



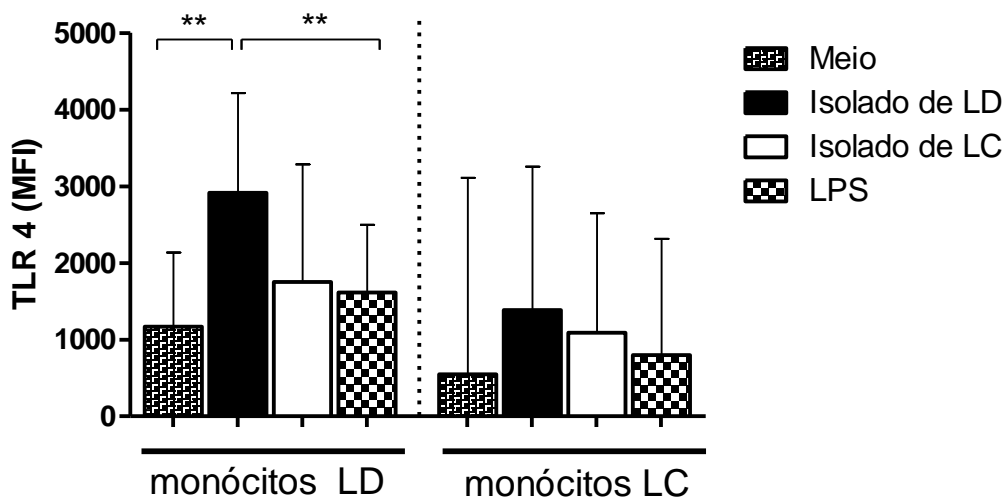
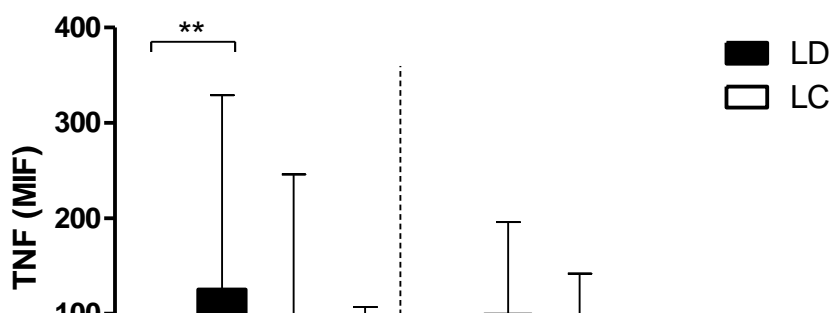


Figura 5- Expressão de TLR2 e TLR4 nos monócitos de pacientes com LD e LC após a infecção dos diferentes isolados de *L. braziliensis*: Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD (n=8) e LC (n=8) foram infectados com os diferentes isolados de *L.braziliensis* (5:1) por 2 horas e em seguida as células foram marcadas com anticorpos anti-CD14 para a caracterização dos monócitos e a expressão dos receptores foi avaliada após a marcação com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4. Como controle positivo da infecção foi utilizado o Pam3Cys (agonista de TLR2) e o LPS (agonista de TLR4). A expressão dos receptores foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados em mediana com intervalos interquartis e todos os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney **p*<0.05 ***p*<0.01.



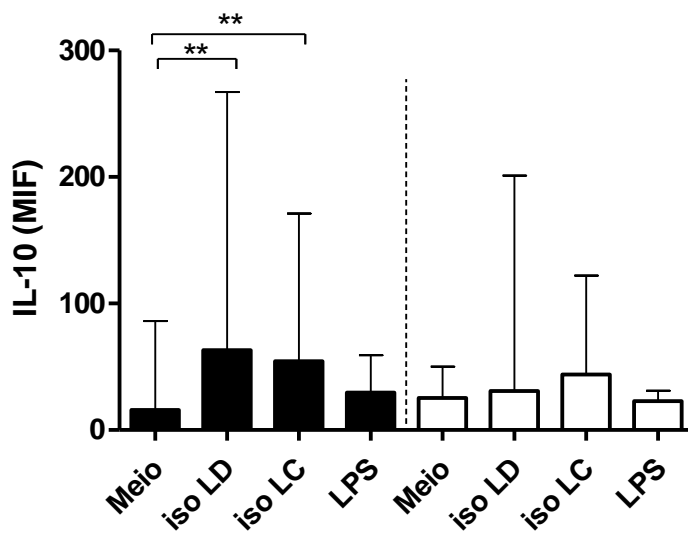
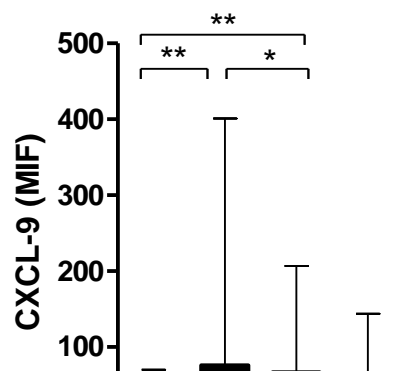


Figura 6- Produção intracelular de TNF e IL-10 em monócitos de pacientes com LD e LC infectados com os diferentes isolados de *L.braziliensis*: Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD (n=8) e LC (n=8) foram infectados com os diferentes isolados de *L.braziliensis* (5:1) por um período de duas horas. A avaliação da produção de TNF (A), IL-10 (B) foi realizada através da técnica de citometria de fluxo após 6 horas de cultura com o Stop Golgi e em seguida marcação dos anticorpos. Todos os valores estão representados em mediana. Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.



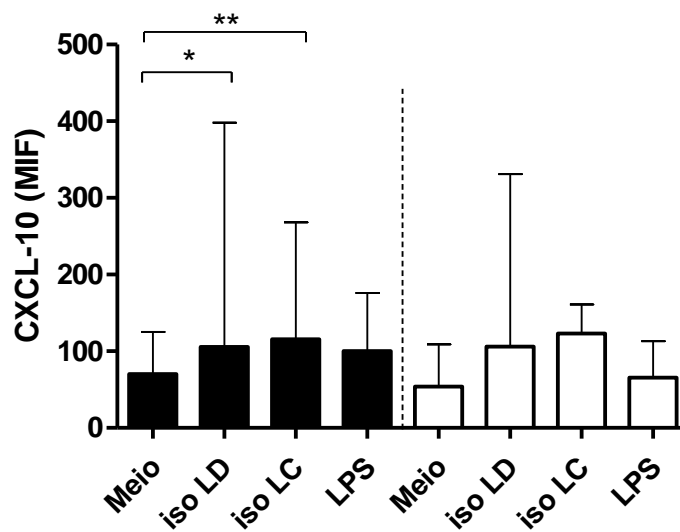


Figura 7- Avaliação da produção intracelular das quimiocinas CXCL9 e CXCL10: Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD (n=8) e LC (n=8) foram infectados com os diferentes isolados de *L.braziliensis* (5:1) por um período de duas horas. A avaliação da produção de CXCL9 (A), CXCL10 (B) foi realizada através da técnica de citometria de fluxo após 6 horas de cultura com o Stop Golgi e em seguida marcação dos anticorpos. Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

SUMÁRIO DE RESULTADOS

1- A frequência de monócitos infectados e a carga parasitária foram maiores após 48 horas de infecção com o isolado de LD quando comparado com o isolado LC em células de ambos os grupos de pacientes.

2- Nos monócitos de LD, LC e CS o número de promastigotas viáveis no sobrenadante de células foi maior com isolado de LD, quando comparado com o número de promastigotas viáveis do isolado de LC.

3- A infecção por *L. braziliensis* isoladas de pacientes com LD induz maior expressão de *burst* oxidativo em monócitos de pacientes com LD, LC e CS.

4- Monócitos de pacientes com LD infectados com isolado de LD expressaram mais TLR2 quando comparado com células não infectadas e com células infectadas com isolado de LC.

5- Monócitos de pacientes com LD infectados com o isolado de LD expressaram mais TNF, IL-10 e CXCL10 quando comparado com células não infectadas, mas não foi observada diferença na produção dessas moléculas entre os diferentes isolados.

6- O isolado de LD induziu uma maior produção de CXCL9 por monócitos de pacientes com LD quando comparado com o isolado de LC.