



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



**O PAPEL DE DIFERENÇAS GENOTÍPICAS DO PARASITA E DA
RESPOSTA IMUNE DO PACIENTE NA PATOGÊNESE DA
LEISHMANIOSE DISSEMINADA CAUSADA POR *Leishmania*
*braziliensis***

Walker Nonato Ferreira Oliveira

Tese de Doutorado

Salvador (Bahia), 2020

Título: O PAPEL DE DIFERENÇAS GENOTÍPICAS DO PARASITA E DA RESPOSTA IMUNE DO PACIENTE NA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE DISSEMINADA CAUSADA POR *Leishmania braziliensis*

Title: THE ROLE OF GENOTYPIC DIFFERENCES OF PARASITE AND THE PATIENT'S IMMUNE RESPONSE IN THE PATHOGENESIS OF DISSEMINATED LEISHMANIASIS CAUSED BY *Leishmania braziliensis*

RESUMO

O PAPEL DE DIFERENÇAS GENOTÍPICAS DO PARASITA E DA RESPOSTA IMUNE DO PACIENTE NA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE DISSEMINADA CAUSADA POR *Leishmania braziliensis*

Introdução: A Leishmaniose Disseminada (LD) é uma forma grave da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), causada pela *Leishmania braziliensis*. É caracterizada pelo aparecimento de 10 até centenas e milhares de lesões cutâneas em várias regiões do corpo. Há fortes evidências sobre a participação da resposta imune na lesão tecidual observada na LTA com alta produção de moléculas inflamatórias. Estudos têm demonstrado que *L. braziliensis* é polimórfica e os isolados que causam LD, apresentam características genotípicas diferentes dos isolados que causam leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM). A via de sinalização de receptores do tipo Toll Like (TLR) é um dos primeiros sistemas de defesa contra a *Leishmania*. Em um estudo anterior, foi demonstrado que os monócitos de pacientes com LC infectados por *L.braziliensis* expressavam níveis mais altos de TLR2 e TLR4 quando comparado com as células de controles saudáveis e esse aumento estava associado à maior produção de TNF. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel de diferentes isolados de *L. braziliensis* na infecção e multiplicação em monócitos, na expressão de TLR2 e TLR4 e na produção de citocinas/quimiocinas em monócitos de pacientes com LC e LD e controles saudáveis (CS). **Material e Métodos:** As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas de pacientes com LC (n=24), LD (n=24) CS (n=12) e infectadas com *L.braziliensis* isoladas de pacientes com LD e LC, na proporção de 5:1. Os monócitos infectados, carga parasitária e o número de leishmanias viáveis foram quantificados por microscopia ótica. A expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos CD14⁺ e a avaliação da produção intracelular de CXCL9, CXCL10, TNF e IL10 após infecção com os diferentes isolados de *L.braziliensis* foi realizada por citometria de fluxo. Fragmento de tecido e sangue periférico de pacientes com LD (n=7) e LC (n=6) foram utilizados para avaliação da expressão de CXCR3 e TNFR em monócitos e linfócitos através da citometria de fluxo. **Resultados:** A infecção, carga parasitária e sobrevivência de *L. braziliensis* isolada de paciente com LD foi maior do que a isolada de paciente com LC em monócitos de pacientes com as duas formas clínicas da leishmaniose bem como de controles saudáveis. A expressão ex vivo de TLR2 foi maior em pacientes com LC e LD em comparação aos CS, porém essa diferença não foi observada na expressão de TLR4. *L. braziliensis* isolada de LD induz

uma expressão maior de TLR2 e TLR4 em pacientes com LD do que com isolado de LC. No entanto, esses resultados não são observados em monócitos de pacientes com LC. *L.braziliensis* isolado de pacientes com LD induziu uma maior produção de CXCL9 e CXCL10 quando comparado ao isolado LC nos monócitos LD, LC e CS. O isolado de LD aumenta a produção de TNF nas células dos três grupos avaliados. Não houve diferença na produção de IL-10 induzida pelos diferentes isolados. Monócitos e linfócitos da lesão expressam com mais intensidade CXCR3 e TNFR do que células do sangue periférico em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose disseminada. **Conclusão:** *L.braziliensis* isolada de pacientes com LD infecta, multiplica, sobrevive e induz uma maior produção de moléculas inflamatórias em monócitos de pacientes com LD mais destacadamente que em outros monócitos, sugerindo que estas células e parasitas podem ter um papel na patogênese da leishmaniose disseminada.

Palavras-Chave: Leishmaniose Disseminada; *Leishmania braziliensis*; Leishmaniose Cutânea; Receptores Toll-Like; Citocinas; quimiocinas

ABSTRACT

THE ROLE OF GENOTYPIC DIFFERENCES OF PARASITE AND THE PATIENT'S IMMUNE RESPONSE IN THE PATHOGENESIS OF DISSEMINATED LEISHMANIOSIS CAUSED BY *Leishmania braziliensis*

Introduction: Disseminated Leishmaniasis (LD) is a severe form of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), caused by *Leishmania braziliensis*. It is characterized by the appearance of 10 to hundreds and thousands of skin lesions in various regions of the body. There is strong evidence about the participation of the immune response in tissue damage seen in ATL with high production of inflammatory molecules. Studies have shown that *L. braziliensis* is polymorphic and the isolates that cause DL have genotypic characteristics that are different from the isolates that cause cutaneous (CL) and mucosa (ML) leishmaniasis. The Toll Like receptor (TLR) signaling pathway is one of the first defense systems against *Leishmania*. In a previous study, it was shown that monocytes from CL patients infected with *L. braziliensis* expressed higher levels of TLR2 and TLR4 when compared to healthy control (HS) cells and this increase was associated with increased TNF production. The aim of this study was to evaluate the role of different isolates of *L. braziliensis* in monocyte infection and multiplication, in the expression of TLR2 and TLR4 and in the production of cytokines/chemokines in monocytes of patients with DL and CL and HS. **Material and Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from patients with CL (n = 24), DL (n = 24) CS (n = 12) and infected with *L. braziliensis* isolated from patients with DL and CL, in the ratio of 5:1. The frequency of infected monocytes, parasitic load and the number of viable leishmanias were quantified by optical microscopy. The expression of TLR2 and TLR4 in CD14 + monocytes and the evaluation of the intracellular production of CXCL9, CXCL10, TNF and IL10 after infection with the different isolates of *L.braziliensis* were performed by flow cytometry. Fragment of tissue and peripheral blood from patients with DL (n = 7) and CL (n = 6) were used to evaluate the expression of CXCR3 and TNFR in monocytes and lymphocytes through flow cytometry. **Results:** The infection, parasitic load and survival of *L. braziliensis* isolated from a patient with DL was greater than that isolated from a patient with CL in monocytes from patients with

both clinical forms of leishmaniasis as well as from healthy controls. The *ex vivo* expression of TLR2 was higher in patients with CL and DL compared to HS, but this difference was not observed in the expression of TLR4. *L. braziliensis* isolated from DL induces greater expression of TLR2 and TLR4 in patients with DL than with isolate from CL. However, these results are not seen in monocytes of patients with CL. *L. braziliensis* isolated from DL patients induced a higher production of CXCL9 and CXCL10 when compared to the isolated CL in monocytes DL, CL and HS. The DL isolate increases the production of TNF in the cells of the three groups evaluated. There was no difference in the production of IL-10 induced by the different isolates. Lesion monocytes and lymphocytes express CXCR3 and TNFR with higher intensity than peripheral blood cells in patients with CL and DL. **Conclusion:** *L.braziliensis* isolated from LD patients infects, multiplies, survives and induces a greater production of inflammatory molecules in monocytes of DL patients more prominently than in other monocytes, suggesting that these cells and parasites may have a role in the pathogenesis of leishmaniasis disseminated.

Keywords: Disseminated Leishmaniasis; Cutaneous Leishmaniasis; *Leishmania braziliensis*; Toll Like receptors; Chemokines; Cytokines

Resultados

	Isolado LD	Isolado LC	Parâmetros
Monócitos LD	↑	↓	Infecção, Carga Parasitária e Sobrevida
	↑	↓	Burst Oxidativo
	↑ ↑	↓	TLR2 e TLR4
	↑	↓	TNF
	↑	↓	CXCL9 e CXCL10
Monócito LC	↑	↓	Infecção, Carga Parasitária e Sobrevida
	↑	↓	Burst Oxidativo
	- ↓	-	TLR2 e TLR4
	-	-	TNF
	↑	↓	CXCL9 e CXCL10
Monócito CS	↑	↓	Infecção, Carga Parasitária e Sobrevida
	↑	↓	Burst Oxidativo
	-	-	TLR2 e TLR4
	-	-	TNF
	-	-	CXCL9 e CXCL10