



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

O PAPEL DO BLOQUEIO *IN VITRO* DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL 2 E DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL 4 NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania braziliensis*

PEDRO PAULO OLIVEIRA CARNEIRO

TESE DE DOUTORADO

SALVADOR – (BAHIA), 2018



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



O PAPEL DO BLOQUEIO *IN VITRO* DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL 2 E DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL 4 NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania braziliensis*

Pedro Paulo Oliveira Carneiro
Orientadora: Maria Olívia Amado Ramos Bacellar

Tese de doutorado 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 Doutor em Ciências da Saúde, da área de concentração em imunologia e Doenças

SALVADOR – (BAHIA), 2018

RESULTADOS

1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Tabela 1: Aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes com leishmaniose cutânea.

LTCP	IDADE	SEXO	TAMANHO DA LESÃO (mm)	DTH (mm)	Falha Terapêutica	Data da coleta	Observações
28943	15	M	08X07	14x13		25/08/17	
28936	17	M	17X16	07x07		25/08/17	
28940	45	M	30X20	17x13		25/08/17	
28629	21	M	07X05	20x18		25/08/17	
28620	25	F	11x05	18X18	Falha Terapêutica	11/08/17	
28632	37	M	20X20	18x17		24/08/17	
28610	33	M	17x17,17x15	18x17		09/06/17	Recidiva em 26/01/18
28630	46	M	10X 04	14x12	Falha Terapêutica	09/06/17	
28408	32	F	18x10	18x18		24/04/17	
28420	25	M	12x10	13x12		24/04/17	
28412	16	M	33x30	12x10	Falha Terapêutica	25/04/17	
28402	43	F	32x15	22x22		28/04/17	
28423	37	F	10x03	11x10		28/04/17	
29276	28	F	17x25	10x09		12/01/18	
29274	32	M	17x25	16x15		12/01/18	
29297	20	M	05x05	09x09		12/01/18	
29264	31	F	12x30	12x10		12/01/18	
29298	20	M	06x04	12x12		12/01/18	
29312	23	M	27x25, 06x06	15x14		26/01/88	
29336	31	M	10x05	20x17		26/01/88	
29322	24	M	14x08, 10x07	22x22		26/01/88	

2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO *ex vivo* DE TLR2 e TLR4 NOS MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA.

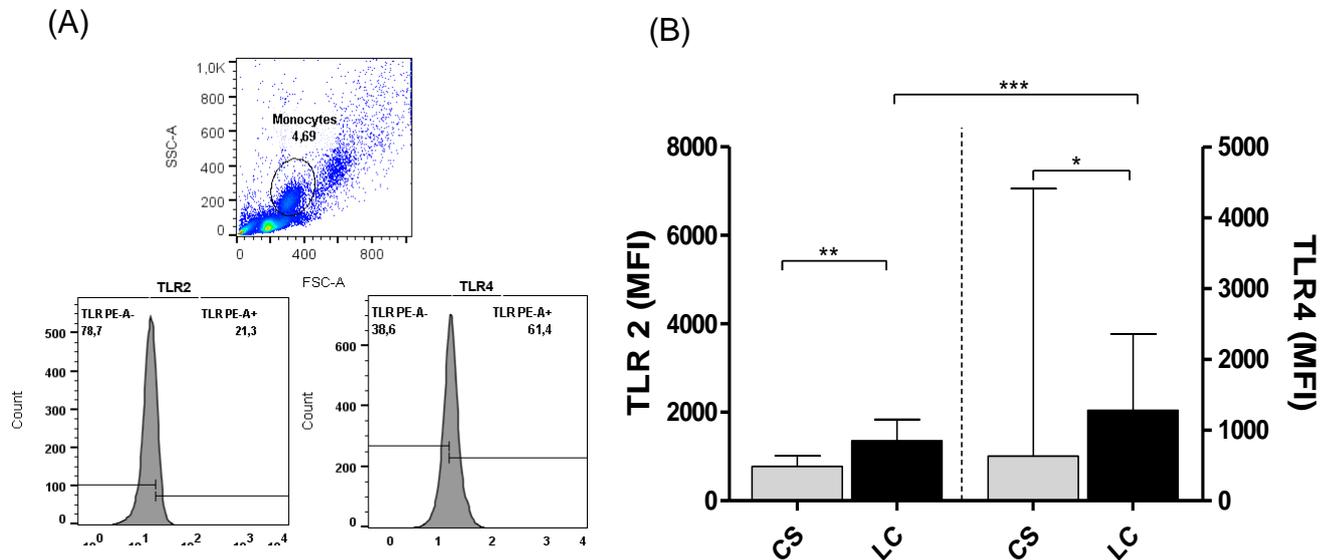


Figura 4: Expressão *ex vivo* de TLR2 e TLR4 nos monócitos de pacientes com LC e CS. CSMPs do sangue periférico de pacientes com LC (n=15) e CS (n=10) foram marcados com anticorpos anti-CD14 para a identificação dos monócitos e em seguida com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4. Os dados foram coletados usando citometria de fluxo e analisados usando o software FLOWJO (Figura A). A expressão *ex vivo* de TLR2 e TLR4 foi avaliada em células CD14⁺ (Figura B). Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Mann Whitney **p*< 0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TLR2 E TLR4 APÓS A INFECÇÃO DE MONÓCITOS COM *Leishmania braziliensis*.

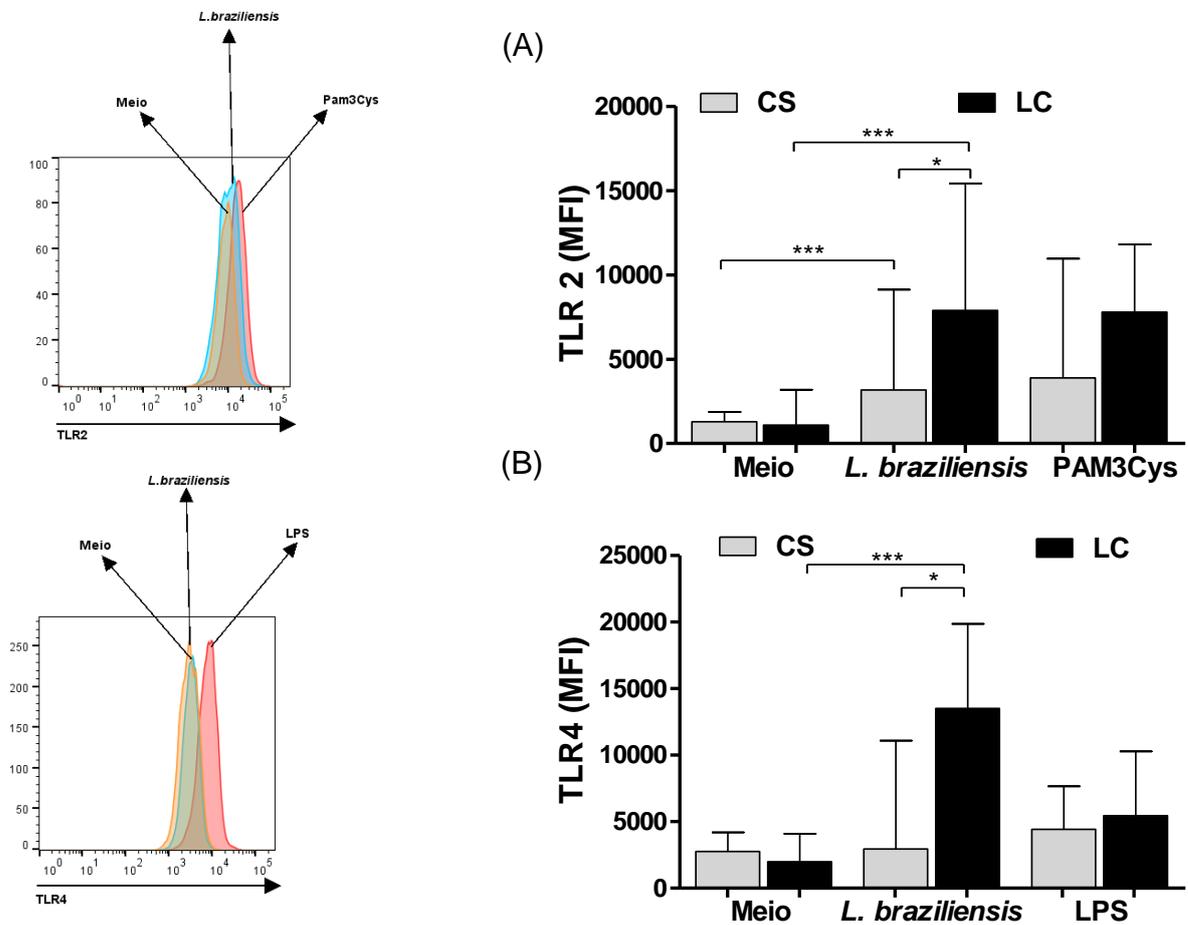


Figura 5: Expressão de TLR2 e TLR4 nos monócitos de pacientes com LC e CS após a infecção por *L.braziliensis*. CSMPs do sangue periférico de pacientes com LC (n=15) e CS (n=10) foram infectados com *L.braziliensis* (5:1) por 2 horas em seguida as células foram marcadas com anticorpos anti-CD14 para a caracterização dos monócitos e a expressão dos receptores foi avaliada após a marcação com anticorpos anti-TLR2 (Figura A) e anti-TLR4 (Figura B). 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 e todos os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Mann Whitney e Wilcoxon **p* < 0.05. ****p* < 0.001

4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TLR2 E TLR4 APÓS A INFECÇÃO DE MONÓCITOS COM *Leishmania braziliensis* GFP+.

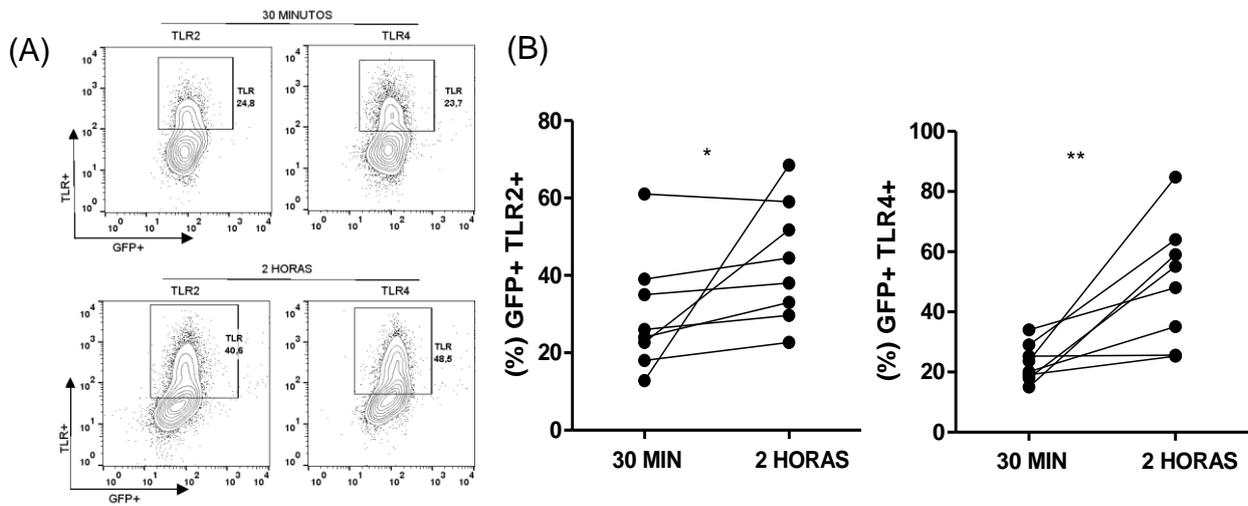


Figura 6: Expressão de TLR2 e TLR4 nos monócitos de pacientes com LC após a infecção por *L.braziliensis* GFP+. Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=08) foram infectados com *L.braziliensis*-GFP+ (5:1) por 30 minutos e 2 horas e em seguida as células foram marcadas com anticorpos anti-CD14 para a caracterização dos monócitos. A expressão dos receptores foi avaliada após a marcação com anticorpos anti-TLR2 (Figura A) e anti-TLR4 (Figura B). A avaliação da expressão dos receptores foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados em mediana e Todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

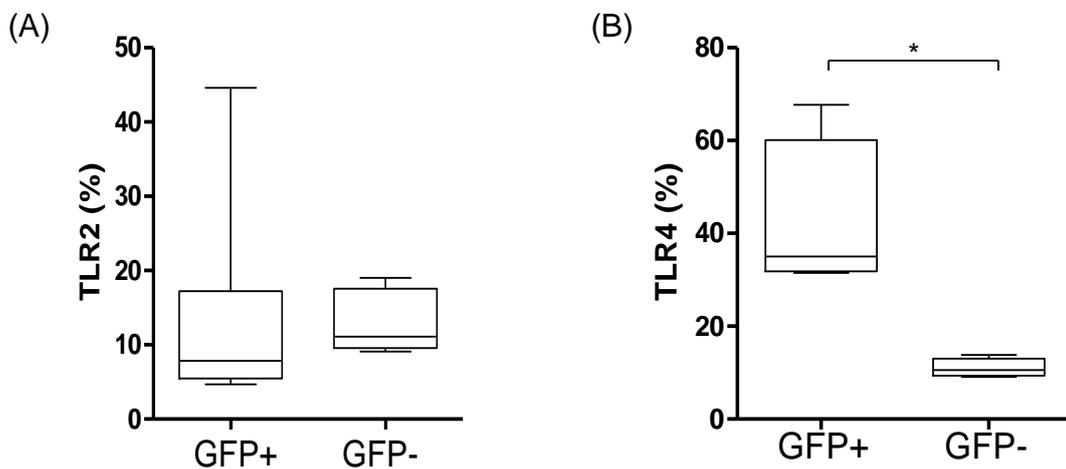


Figura 7 : Frequência de TLR2 e TLR4 nos monócitos de pacientes com LC após a infecção por *L.braziliensis* GFP+. Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=08) foram infectados com *L.braziliensis*-GFP+ (5:1) por 2 horas e em seguida as células foram marcadas com anticorpos anti-CD14 para a caracterização dos monócitos e a expressão dos receptores foi avaliada após a marcação com anticorpos anti-TLR2 (Figura A) e anti-TLR4 (Figura B). A avaliação da expressão dos receptores foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Mann Whitney * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5. NEUTRALIZAÇÃO DOS RECEPTORES TLR2 E TLR4 EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

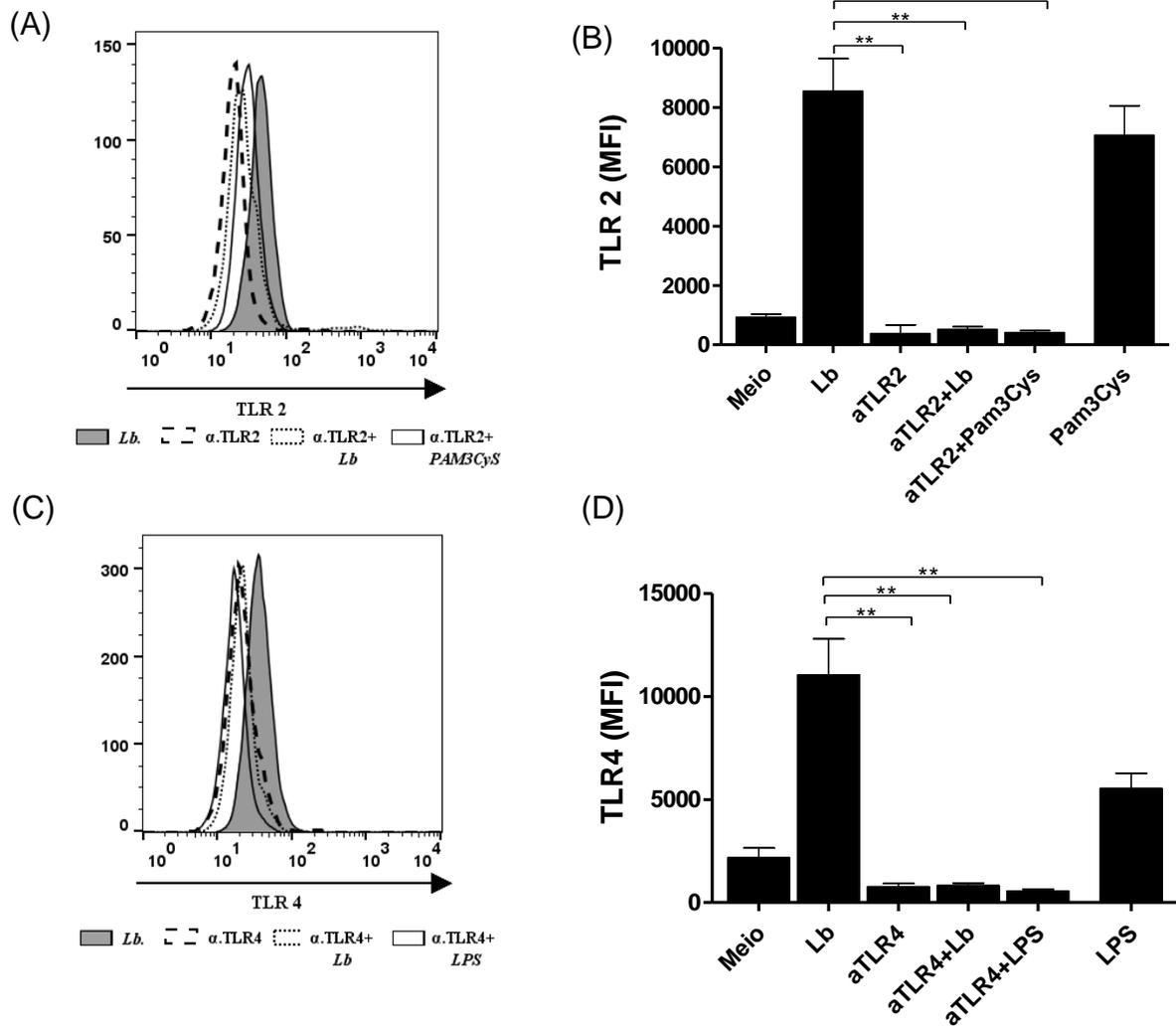


Figura 8: Avaliação da neutralização dos TLR2 e TLR4 em células de pacientes com LC. Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=15) foram neutralizados com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4 e em seguida foram infectados com *L.braziliensis* (5:1). As células foram marcadas com anticorpos anti-CD14 para a caracterização dos monócitos e a expressão dos receptores foi avaliada após a marcação com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4. A expressão dos receptores foi realizada através da técnica de citometria de fluxo e a análise foi feita através do programa FlowJo (Figura A e B). Os dados foram representados em mediana da média de intensidade de fluorescência da expressão de TLR2 (Figura C) e da expressão de TLR4 (Figura D). Como controle positivo da infecção foi utilizado o Pam3Cys (agonista de TLR2) e o LPS (agonista de TLR4). Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon, $**p < 0.01$.

6. AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE AMASTIGOTAS INTERNALIZADAS NOS MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E CONTROLES SADIOS, APÓS A NEUTRALIZAÇÃO DE TLR2 E TLR4

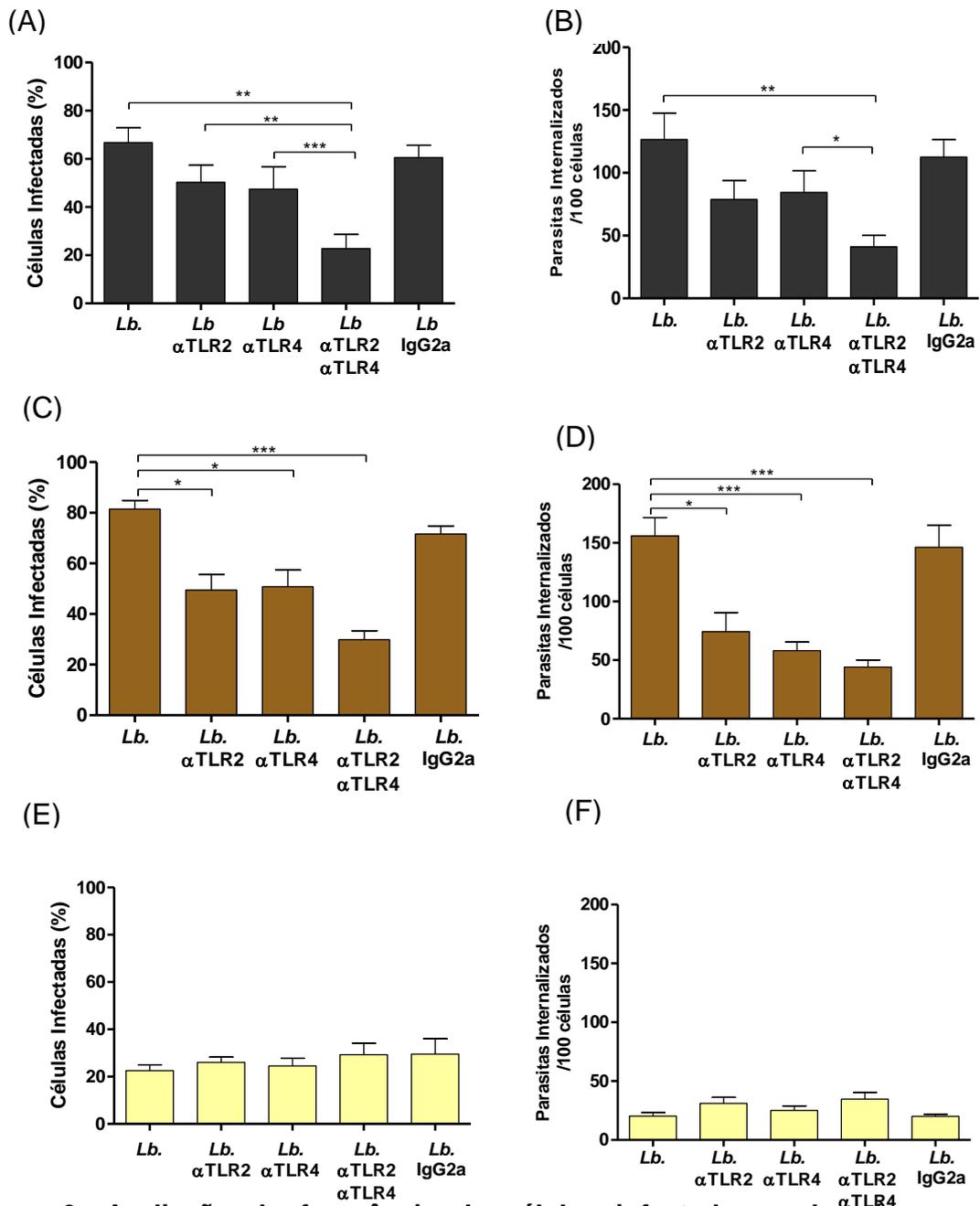


Figura 9: Avaliação da frequência de células infectadas e do número de parasitas internalizados após a neutralização dos TLR2 e TLR4. Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=15) foram neutralizados com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4 e em seguida infectados com *L.braziliensis* (5:1) por 2 e 48 horas. O número de células infectadas após 2 horas (Figura A), 48 horas (Figura C) e 72 horas (Figura E), e o número de parasitas internalizados após 2 horas (Figura B), 48 horas (Figura D) e 72 horas (Figura F) foram quantificadas através da técnica de microscopia óptica. Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon $p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

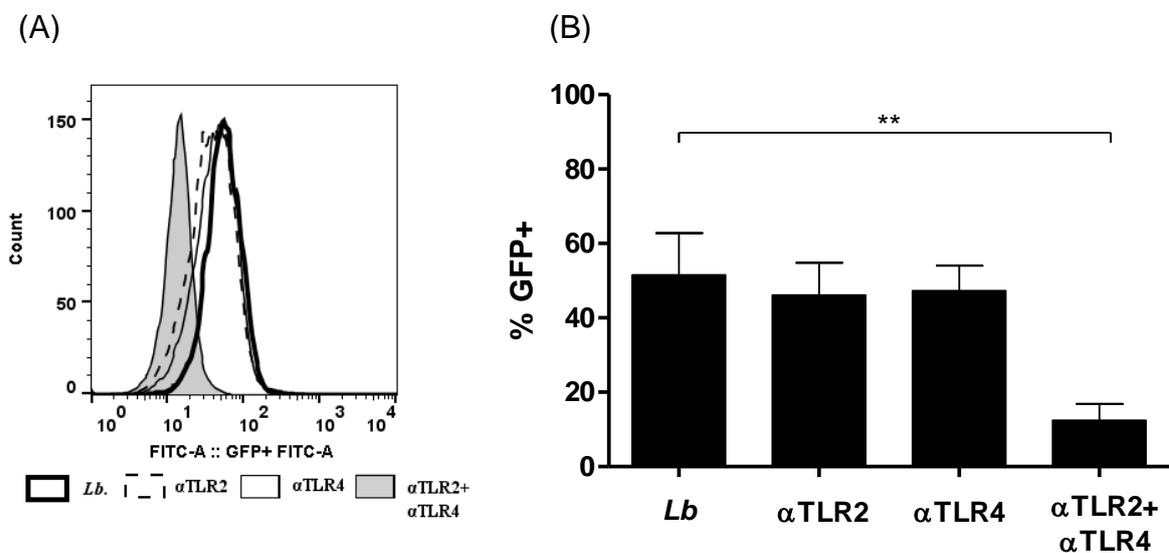


Figura 10: Frequência de monócitos de pacientes com LC infectados com *L.braziliensis* GFP+ após a neutralização do TLR2 e do TLR4. Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=08) foram neutralizados com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4 e em seguida infectados com *L.braziliensis*-GFP+ (5:1) por 2 horas. A avaliação da expressão dos receptores foi realizada através da técnica de citometria de fluxo (Figura A). O número de células GFP (+) após o bloqueio está apresentado na figura B. Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon **p*< 0.05, ***p*<0.01.

7. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO TLR2 E DO TLR4 NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *L. braziliensis* EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA.

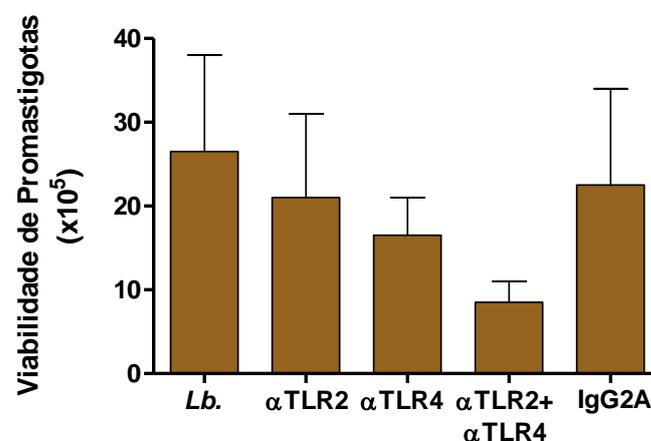


Figura 11: Avaliação do bloqueio do TLR2 e do TLR4 no controle da infecção por *L.braziliensis* nos monócitos de pacientes com LC. CSMPs do sangue periférico de pacientes com LC (n=8) foram neutralizados com anticorpos anti-TLR2 e anti-

TLR4e em seguida infectados com *L.braziliensis* (5:1) por 72 horas. Após o tratamento das culturas com os bloqueadores anti-TLR2 e anti-TLR4 e infecção com *L.braziliensis* por 72 horas, o meio de cultura foi substituído pelo meio para crescimento de leishmanias, (Schneider) por mais 72 horas (n=5) e o número de promastigotas viáveis nos sobrenadantes das culturas foi avaliado através da contagem em câmara de Neubauer (Figura B). Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon. $p > 0,05$

8. EFEITO DA NEUTRALIZAÇÃO DE TLR2 E TLR4 NA PRODUÇÃO DA EXPLOSÃO RESPIRATÓRIA EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

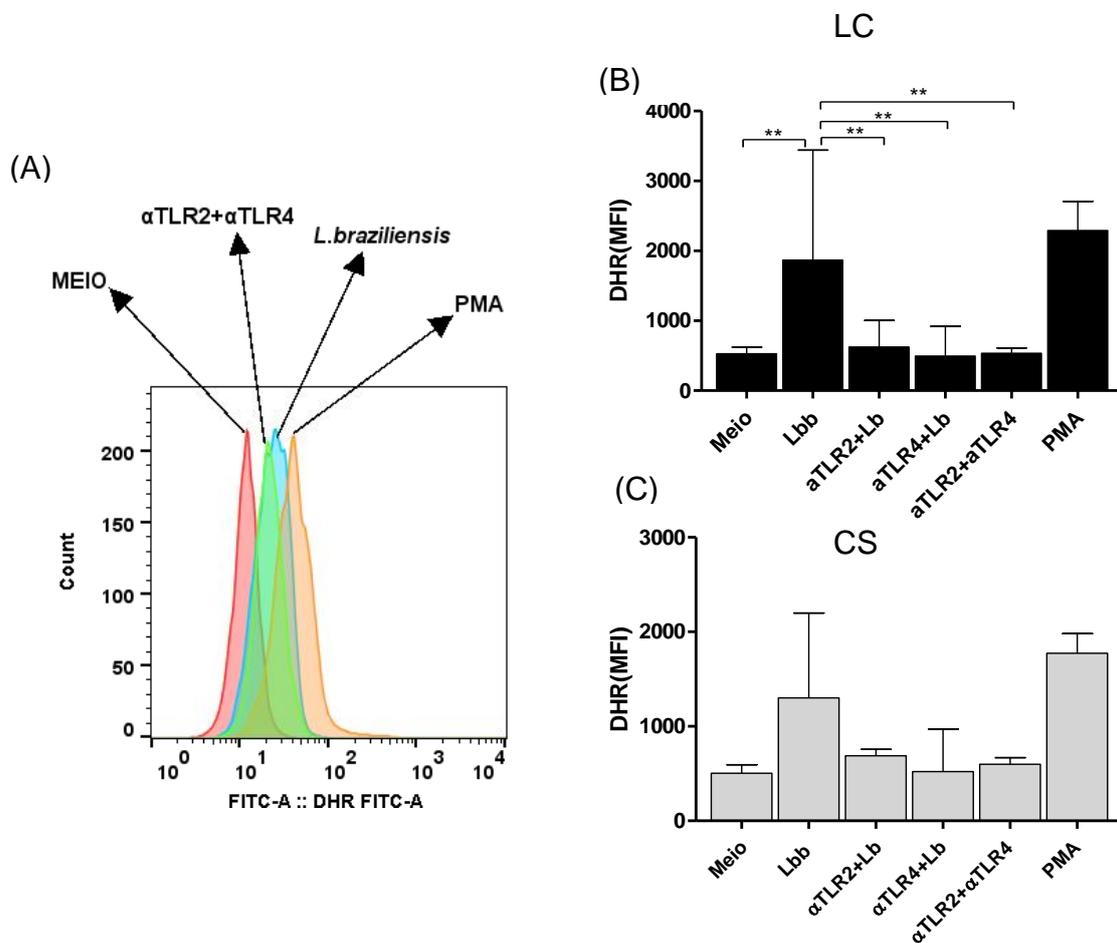


Figura 12: Neutralização de TLR2 e TLR4 interfere na explosão respiratória por monócitos de pacientes com LC. Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=10) e CS (n=10) foram neutralizados com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4 e em seguida infectados com *L.braziliensis* (5:1) por 25 minutos. As células foram marcadas com anticorpos anti-CD14 para a caracterização dos monócitos. A produção da explosão respiratória foi mensurada a partir da oxidação do DHR. A expressão dos receptores foi realizada através da técnica de citometria de fluxo e a análise foi feita através do programa FlowJo (Figura A). Os dados foram representados em mediana da média de intensidade de fluorescência da expressão de DHR nos monócitos de pacientes com LC (Figura B) e de monócitos de CS (Figura C). Como controle positivo à produção da explosão respiratória foi utilizado o PMA. Os resultados estão

apresentados em mediana e todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon $**p < 0.01$.

9. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS TNF E IL-1 β APÓS A NEUTRALIZAÇÃO DOS RECEPTORES TLR2 E TLR4 EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E CONTROLES SADIOS

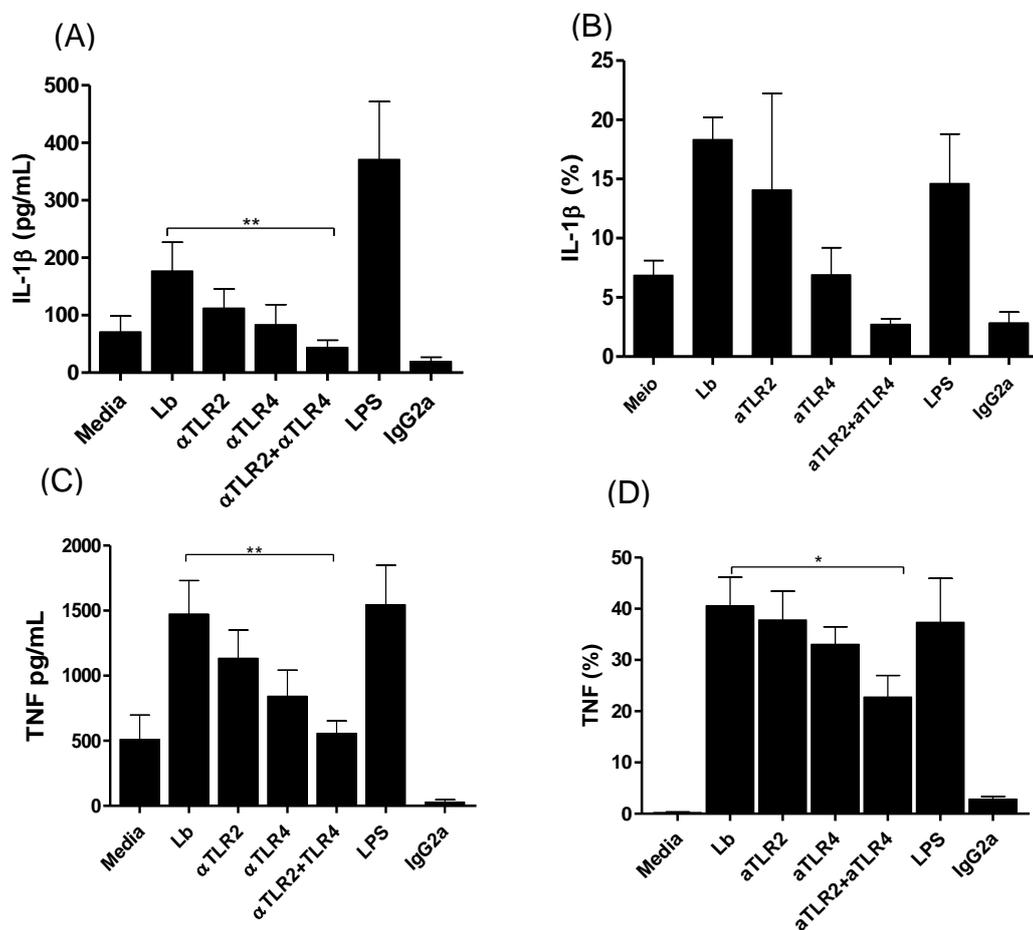


Figura 13: Avaliação da produção das citocinas TNF e IL-1 β . CSMPs do sangue periférico de pacientes com LC (n=15), foram tratados ou não com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4. As células foram infectadas com *L. braziliensis* (5:1) por 48 horas. A produção de IL-1 β foi quantificada através da técnica de ELISA (Figura A) e a frequência de células que expressam IL1 β (n=5) foi realizada através da técnica de citometria de fluxo (Figura B). A expressão de TNF foi avaliada através da técnica de de ELISA, após 8 horas de infecção (Figura C), e a frequência de células produtoras de TNF foi avaliada através da técnica de citometria de fluxo, (Figura 6D. Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

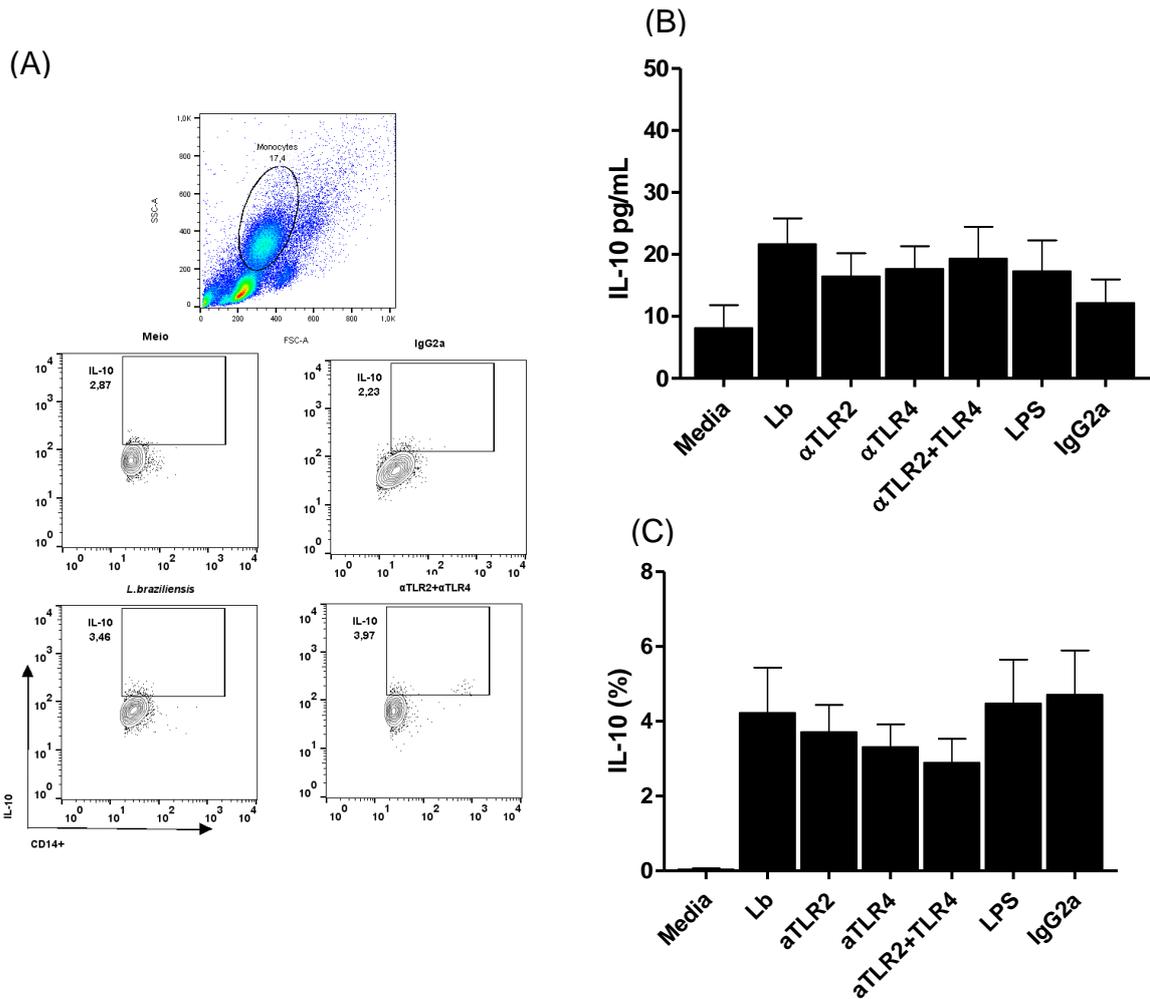


Figura 14: Avaliação da produção de IL-10. Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=15), foram tratados ou não com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4. As células foram infectadas com *L.braziliensis* (5:1) por 48 horas. A representação da estratégia utilizada para a análise com a técnica de citometria de fluxo (Figura A). A produção de IL-10 foi quantificada através da técnica de ELISA (Figura B). A expressão de IL-10 foi avaliada através da técnica de citometria de fluxo, sendo apresentada através da frequência de células (Figura 6C). Os resultados estão apresentados em mediana. Os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon, $p>0.05$.

10. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS QUIMIOCINAS CXCL9 E CXCL10 EM MONÓCITOS DE PACIENTES APÓS A NEUTRALIZAÇÃO DOS RECEPTORES TLR2 E TLR4

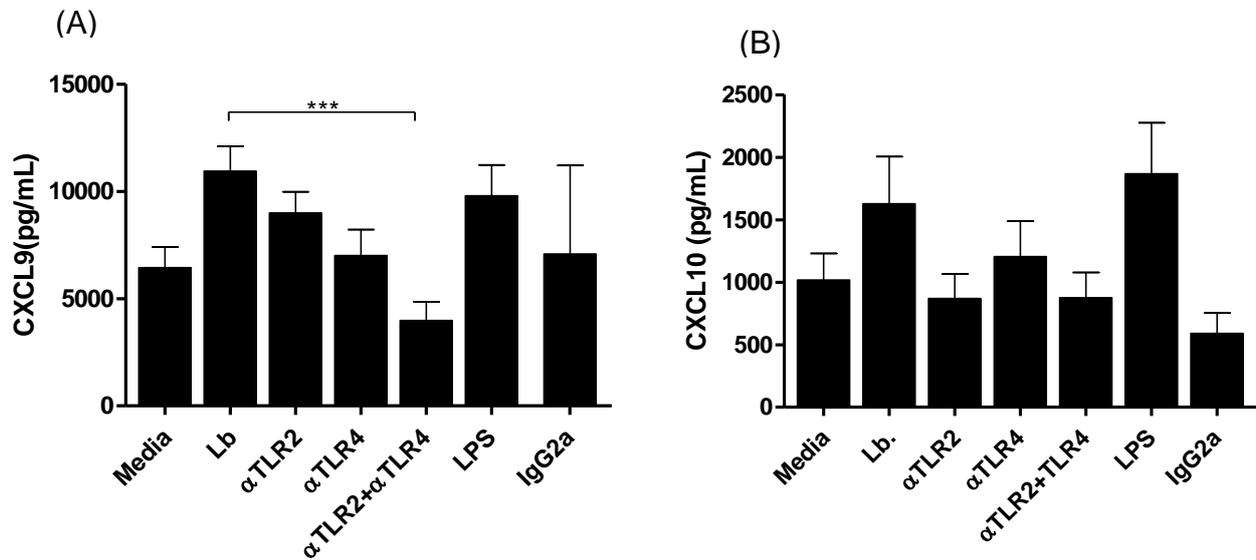


Figura 15: Avaliação da produção das quimiocinas CXCL9 e CXCL10. Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=15), foram tratados ou não com anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4. As células foram infectadas com *L.braziliensis* (5:1) por 48 horas. A produção de CXCL9 (Figura A) e CXCL10 (Figura B) foi quantificada através da técnica de ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon, *** p <0.001.

11. EFEITO DA NEUTRALIZAÇÃO DE TLR2 E TLR4 EM CÉLULAS DE BIOPSIAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

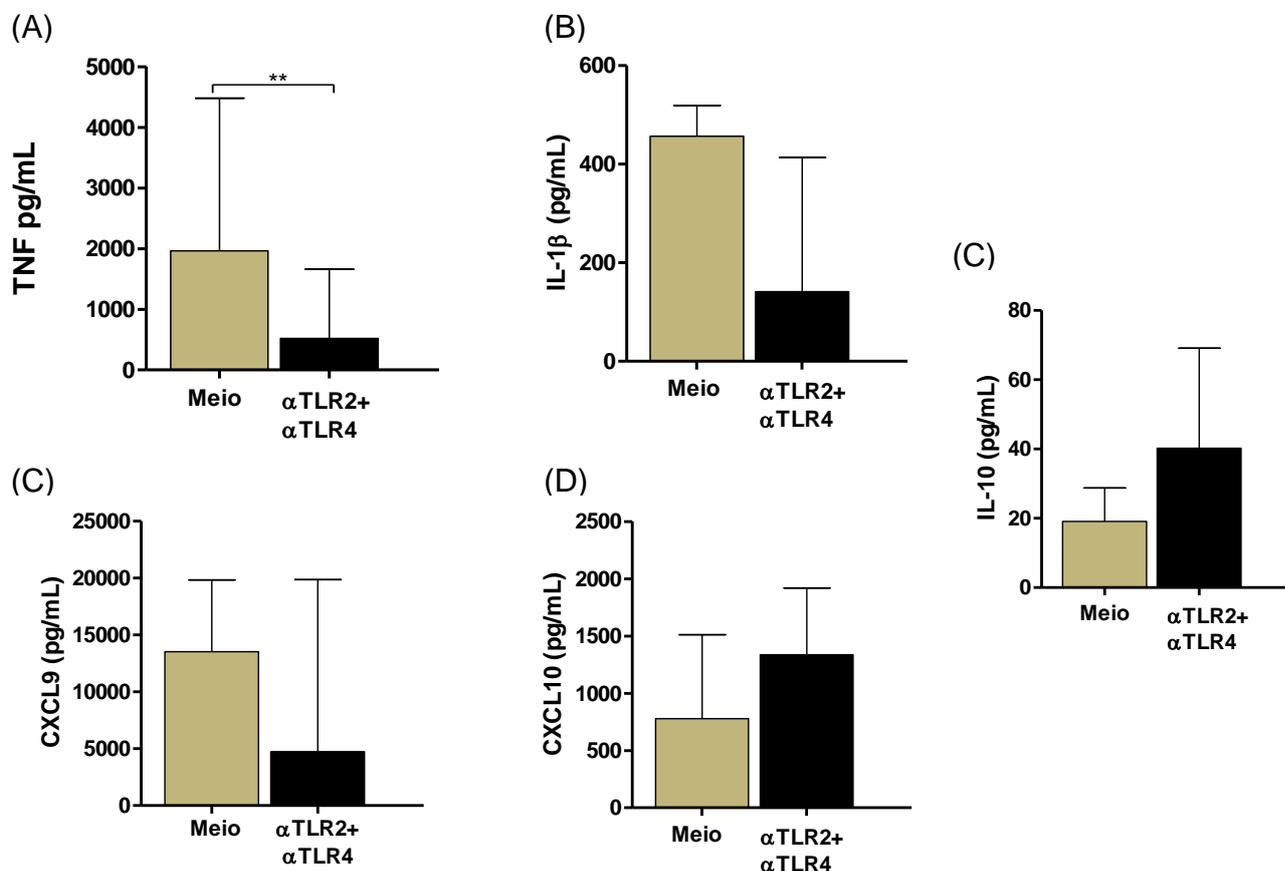


Figura 16: Avaliação da produção das citocinas e quimiocinas por células de biopsias de pacientes com LC. As biopsias (n=9) foram divididas em 2 fragmentos de igual peso e em seguida tratadas ou não com os anticorpos neutralizadores anti-TLR2 e anti-TLR4. Os sobrenadantes das culturas foram coletados após 48 horas e as citocinas TNF (Figura A), IL-1 β (Figura B), IL-10 (Figura C) e as quimiocinas CXCL9 (Figura D) e CXCL10 (Figura D) foram quantificadas através da técnica de ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon $p < 0.01$.

I. RESUMO

Introdução: A Leishmaniose cutânea humana (LC) causada por *Leishmania braziliensis* caracteriza-se pelo aparecimento de uma lesão, geralmente única, e por uma forte resposta inflamatória que está associada ao desenvolvimento da úlcera leishmaniótica. Os monócitos/macrófagos são as principais células que albergam o parasito e também são responsáveis pela sua destruição. Monócitos/macrófagos de pacientes com LC infectados com *L. braziliensis* produzem mais moléculas inflamatórias quando comparado com células de controles sadios (CS), mas não tem capacidade de eliminar a leishmania. A via de sinalização dos receptores Toll-like (TLR) é um dos primeiros sistemas de defesa contra patógenos e leva à transcrição de mediadores inflamatórios como a produção de IL-1 β e TNF durante a resposta imune inata. Recentemente nós documentamos que monócitos de pacientes com LC expressavam mais TLR2 e TLR4 do que células de CS e essa expressão estava associada a maior produção de TNF, principal citocina associada ao desenvolvimento da lesão na LC. O uso de drogas antagonistas de TLRs já tem sido avaliado em modelos pré-clínicos e clínicos de doenças inflamatórias. A nossa hipótese é que o bloqueio desses receptores pode atenuar a forte resposta inflamatória observada nessa doença. **Objetivos:** Avaliar o papel de antagonistas de TLR2 e TLR4 na modulação da forte resposta inflamatória observada na LC causada por *L.braziliensis*. **Métodos:** Monócitos de pacientes com LC e de CS foram tratados com anticorpos bloqueadores de TLR2 e TLR4 e infectados com *L.braziliensis*. A expressão da explosão respiratória foi analisada através da citometria de fluxo. A avaliação da infecção dos monócitos foi determinada por microscopia óptica. Células da lesão também foram tratadas com anticorpos bloqueadores de TLRs. A avaliação da produção de quimiocinas e citocinas foi avaliada através de citometria de fluxo e da técnica imunoenzimática (ELISA). **Resultados:** A expressão de TLR2 e TLR4 *ex vivo* e após infecção em monócitos de pacientes com LC foi maior quando comparado com monócitos de CS. O bloqueio de TLR2 e TLR4 reduziu a resposta oxidativa em células de pacientes com LC, mas não em células de CS. Após o bloqueio desses receptores o número de células infectadas e do número de parasitas internalizados diminuiu nos monócitos de pacientes com LC. O bloqueio simultâneo desses receptores também diminuiu a produção de IL1 β e TNF por monócitos de pacientes com LC. Também foi observada uma diminuição da produção de TNF por células das biópsias após bloqueio simultâneo dos receptores. **Conclusão:** Os resultados desse estudo sugerem que os receptores TLR2 e TLR4 participam do processo de internalização da *Leishmania braziliensis* e da forte resposta inflamatória responsável pelo desenvolvimento da úlcera leishmaniótica. E abre perspectivas para o uso de drogas anti-inflamatórias, bloqueadoras desses receptores, como terapêutica associada ao tratamento convencional.