Felipe Francisco Bondan Tuon

Identificação e quantificação da expressão de receptores *toll-like* 2, 4 e 9 na leishmaniose cutânea humana

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências**

Programa de: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Dr. Valdir Sabbaga Amato
Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Irma
Seixas Duarte

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tuon, Felipe Francisco Bondan

Identificação e quantificação da expressão de receptores *toll-like* 2, 4 e 9 na leishmaniose cutânea humana / Felipe Francisco Bondan Tuon. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Valdir Sabbaga Amato.

Co-orientadora: Maria Irma Seixas Duarte.

Descritores: 1.Leishmania 2.Leishmaniose cutânea/imunologia 3.Receptores toll-like 4.Imunoistoquímica.

USP/FM/DBD-084/11

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Valdir Sabbaga Amato pelas diversas oportunidades que me ofereceu e pela orientação nas mais importantes pesquisas científicas realizadas em minha vida, gerando publicações nas melhores revistas de Infectologia do mundo e, acima de tudo isso, pela amizade que construímos em todos esses anos.

A Professora Dra. Maria Irma, pessoa fundamental na minha tese, que deu todo o apoio desde o início do trabalho até o último ponto final. Além das diversas oportunidades de pesquisa nestes anos de convívio.

A os amigos do Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Um agradecimento especial a Elaine Fernandes, sem a qual minha tese não estaria aqui.

Aos amigos ex-residentes da Infectologia da USP, Alan Brito Neves, André Luiz Machado, Vivian Iida Silva, Silvia Goulart, André Machado Silveira e Jéssica.

Agradecimento especial para o meu grande amigo Hermes por todo apoio durante estes anos.

Á minha mulher, Juliana, e aos meus filhos, Mateus, Pedro e Bernardo, por todo amor e por terem superado a distância e todo o tormento que foi nestes últimos anos.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:
Referências: adaptação de *International Committee of Medical Journals Editors*
(Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª. Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	5
3.	REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1	Parasito e formas clínicas	6
3.2	Epidemiologia e espécies da leishmaniose tegumentar americana	7
3.3	Patogenia	8
3.4	Reconhecimento da leishmânia pelo sistema imune	11
3.5	Receptores <i>toll-like</i>	12
3.6	Receptores <i>toll-like</i> e <i>Leishmania</i>	15
3.6.1	Leishmânia ativa TLR?	15
3.6.2	Qual TLR está envolvido no reconhecimento da leishmânia?	15
3.6.3	Qual célula expressa TLR na <i>leishmaniose</i> ?	16
3.6.4	Qual antígeno da leishmânia é reconhecido pelo TLR?	17
4.	MÉTODOS	19
4.1	Casuística	19
4.2	Área	20
4.3	Aspectos éticos	20
4.4	Pacientes e testes	21
4.5	Exame histopatológico	21
4.6	Reação em cadeia da polimerase (PCR) para <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	22
4.7	Imunoistoquímica e imunomarcção	23
4.7.1	Imunoistoquímica para identificação de antígenos de <i>Leishmania</i>	23
4.7.2	Imunomarcção para determinação do fenótipo das células inflamatórias	24
4.7.3	Imunomarcção para detecção de citocinas	25
4.7.4	Técnica de imunomarcção para determinação de receptores <i>toll-like</i>	26
4.8	Estudos semiquantitativo e quantitativo	26
4.9	Dupla marcação por imunoistoquímica	27
4.10	Análise estatística	28
5.	RESULTADOS	29
5.1	Descrição dos casos incluídos e excluídos	29
5.1.1	Fenótipos celulares	30
5.1.2	Expressão de citocinas	33
5.1.3	Expressão de TLR	34
5.1.4	Correlação entre TLR, fenótipos celulares e citocinas	41
5.1.5	Dupla marcação	45

6.	DISCUSSÃO	47
6.1	Receptor Toll-like 2	47
6.2	Receptor Toll-like 4	51
6.3	Receptor Toll-like 9	52
6.4	Receptores Toll-like e a epiderme	54
6.5	Receptor Toll-like e endotélio	56
6.6	Considerações finais	57
7.	CONCLUSÕES	59
8.	ANEXOS	61
9.	REFERÊNCIAS	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	analysis of variance
BSA	albumina de soro bovino
CD	cluster of differentiation
Cm	centímetros
CR3	receptor de complemento 3
CSA	catalyzed Signal Amplification
DAB	diaminobenzidina
DC	Célula Dendrítica
DC-SIGN	DC-Specific Intercellular adhesion molecule-Grabbing Nonintegrin
dsDNA	double-strain DNA
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELAM	endothelial leukocyte adhesion molecule
GILP	glicoinositolfosfoipídeo
gp63	glicoproteína 63
HSP65	heat shock protein 65
IFN	interferon
IL	interleucina
LPG	lipofosfoglicano
LPS	lipopolissacarídeo
LPS	lipopolissacáride
LTA	leishmaniose tegumentar americana
M	molar
MHC	major histocompatibility complex
mL	mililitro
mm	milímetros
mm	micrômetros
NF-κB	fator nuclear kappa B
NK	natural killer
PAMPs	moléculas padrão associadas ao patógeno
PBS	phosphate buffered saline
PCR	reação em cadeia da polimerase
PPG	peptideofosfoglicano
Th	T helper
TIR	toll/IL-1 receptor-like
TLR	receptor toll-like
TNF	fator de necrose tumoral

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos pacientes incluídos no estudo

Tabela 2 – Média da contagem de células que expressaram cada fenótipo celular e a expressão de TLR2, TLR4 e TLR9

Tabela 3 - Média de células expressando citocinas em pacientes com leishmaniose cutânea

Tabela 4 – Análise semi-quantitativa de expressão de receptores TLR2, TLR4 e TLR9 na epiderme

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado da resposta imune na leishmaniose cutânea até a formação da ulcera cutânea.

Figura 2 – Figura mostrando resumidamente a resposta intra-celular após a ativação dos receptores *toll-like*.

Figura 3 – Casos incluídos e excluídos no estudo de avaliação de receptores Toll-like em pacientes com leishmaniose cutânea

Figura 4 – Aspecto microscópico das diversas células marcadas por imunistoquímica no tecido de pacientes com leishmaniose cutânea

Figura 5 – Média dos fenótipos celulares com expressão de receptores TLR2, TLR4 e TLR9 na derme

Figura 6 – Média dos fenótipos celulares na derme de pacientes com leishmaniose cutânea

Figura 7 – Características de expressão de TLR2 no epitélio em todos os casos estudados e na pele normal (N1, N2, N3 e N4) (aumento 400x)

Figura 8 – Características de expressão de TLR4 no epitélio em todos os casos estudados e na pele normal (N1, N2, N3 e N4) (aumento 400x)

Figura 9 – Expressão de TLR9 na epiderme. Acima – pele de pacientes com leishmaniose cutânea (aumento 250x); abaixo - pele normal (aumento 400x)

Figura 10 – Aspecto microscópico da expressão de TLR2 e TLR4 na derme de pacientes com leishmaniose (lado direito) em relação à pele normal (lado esquerdo) (aumento 1000x)

Figura 11 – Padrão de expressão de TLR9 restrito ao granuloma. Direita: granuloma em aumento 250x; meio: granuloma em aumento 400x e; destaque para a célula gigante multinucleada expressando TLR9

Figura 12 – Aspecto da expressão de TLR2 e TLR4 no endotélio de pele normal e a ausência em pacientes com leishmaniose cutânea (aumento 400x)

Figura 13 – Regressão linear demonstrando ausência de correlação entre a expressão fenotípica e a quantidade de TLR2 em cada paciente.

Figura 14 – Regressão linear demonstrando ausência de correlação entre a expressão fenotípica e a quantidade de TLR4 em cada paciente.

Figura 15 – Regressão linear demonstrando ausência de correlação entre a quantidade de citocinas e a quantidade de TLR2 em cada paciente.

Figura 16 – Regressão linear demonstrando ausência de correlação entre a quantidade de citocinas e a quantidade de TLR4 em cada paciente.

Figura 17 – Regressão linear demonstrando ausência de correlação entre a expressão fenotípica e a quantidade de TLR9 em cada paciente

Figura 18 – Regressão linear demonstrando a correlação entre a expressão de citocinas e a quantidade de TLR9 em cada paciente

Figura 19 – Dupla marcação demonstrando macrófagos expressando TLR2. A) célula expressando apenas o TLR2; B) células expressando TLR2 e CD68+; C) células expressando apenas CD68+ (aumento 1000x)

RESUMO

TUON FF. Identificação e quantificação da expressão de receptores toll-like 2, 4 e 9 na leishmaniose cutânea humana [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 81p.

Introdução: Um dos primeiros sistemas de defesa contra os microrganismos é a via dos receptores Toll-like (TLRs). A ativação destes receptores leva à síntese de citocinas, dando início à resposta imune inata. Em modelos animais, o TLR2, TLR4 e TLR9 parecem estar relacionados com o reconhecimento de antígenos de *Leishmania*. A relação entre TLRs e leishmânia pode ser um mecanismo chave no desenvolvimento da doença ou no controle da mesma. Até o momento não existem estudos de TLRs na leishmaniose cutânea humana. **Objetivo:** Determinar o padrão de expressão e as células associadas com o TLR2, TLR4 e TLR9 na leishmaniose cutânea. O objetivo secundário é correlacionar a quantidade de TLRs com a quantidade de citocinas e células inflamatórias na pele. **Métodos:** Cem biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea causadas por *Leishmania* (V.) *braziliensis* foram selecionadas inicialmente. Apenas os casos confirmados (presença de amastigotas no raspado, teste de Montenegro positivo, imunoistoquímica com presença de antígenos de *Leishmania* e reação em cadeia da polimerase com DNA de *Leishmania* (V.) *braziliensis* foram incluídos. Um grupo controle de pele normal foi incluído para comparação (quatro casos). A expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 foi determinada por técnica imunoistoquímica, da mesma forma que os fenótipos celulares (células NK, macrófagos, células dendríticas, células CD4 e CD8) e citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF-alfa, IFN-gama). Dupla-marcação foi realizada para identificar as células que expressaram os TLRs analisados. Análise semi-quantitativa foi utilizada para avaliação da expressão de TLRs na epiderme, enquanto na derme foi realizada análise quantitativa. O nível de significância foi estabelecido com $p < 0,05$. **Resultados:** Doze casos preencheram os critérios de inclusão. Os pacientes eram todos masculinos, com lesões apenas em membros inferiores e mediana de idade de 23 anos [16-47]. A expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 na epiderme da pele normal foi alta. Quando comparados com pele normal, tanto TLR4 quanto TLR2 mostraram menor expressão no epitélio dos pacientes com leishmaniose e não houve expressão de TLR9. A média de células expressando TLR2 na derme foi de $136,36 \pm 82,46$ células/mm², ao passo que a média de células expressando TLR4 foi de $3,21 \pm 4,11$ células/mm². A contagem de TLR9 foi de $86,15 \pm 88,36$ células/mm² predominando em áreas de formação de granulomas. A regressão linear não demonstrou relação entre a contagem de células marcadas ou citocinas com TLR2 ou TLR4. O aumento proporcional da expressão de TLR9 relacionou-se com maior expressão de IL-12 e IL-4 ($p < 0,05$). A dupla marcação demonstrou que os macrófagos expressaram TLR2. A dupla marcação não mostrou expressão de TLR2 nas células dendríticas e nas células NK. **Conclusão:** A leishmaniose cutânea localizada associa-se com a presença de TLR2, TLR4 e TLR9. No epitélio a expressão de TLR2 e TLR4 em pacientes com leishmaniose está diminuída em relação aos pacientes controles. A expressão do TLR2 na derme é estatisticamente maior que a de TLR4 e TLR9, a qual é expressa pelos macrófagos. A expressão de TLR9 ocorre principalmente nas áreas de granulomas havendo relação com a expressão de IL-12 e IL-4.

Descritores: 1. *Leishmania*; 2. Leishmaniose cutânea/imunologia; 3. Receptores Toll-like; 4. Imunoistoquímica

SUMMARY

TUON FF. Identification and quantification of the expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 in the human cutaneous leishmaniasis [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Introduction: One of the first systems of defense against microorganisms is the Toll-like receptors (TLRs) pathway. The activation of these receptors promotes the cytokine synthesis, initiating the innate immune response. In animal models, TLR2, TLR4 and TLR9 appear to be related to the recognition of antigens of *Leishmania*. The relationship between TLRs and *Leishmania* can be a key mechanism in the development of the disease or its control. Until now, there are not studies about TLRs in human cutaneous leishmaniasis. **Objective:** To determine the expression pattern and the cells associated with TLR2, TLR4 and TLR9 in cutaneous leishmaniasis. The secondary objective is to correlate the amount of TLRs with the amount of cytokines and inflammatory cells. **Methods:** One hundred biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) braziliensis* were initially selected. Only confirmed cases of cutaneous leishmaniasis were included in the analysis (presence of amastigotes in the scraping, positive Montenegro test, immunohistochemistry with the presence of *Leishmania* antigens and polymerase chain reaction with DNA from *Leishmania (V.) braziliensis*). A control group (4 cases) of normal skin was included for comparison. The expression of TLR2, TLR4 and TLR9 was determined by immunohistochemistry, as well as cell phenotypes (NK cells, macrophages, dendritic cells, CD4 and CD8) and cytokines (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ). Double-staining was used to determine the cells expressing TLRs. Semi-quantitative analysis was used for evaluation of the expression of TLRs in the epidermis. Quantitative analysis was performed to evaluate the expression in the dermis. The level of significance was defined as $p < 0.05$. **Results:** 12 cases fulfilled inclusion criteria. The patients were all male, with lesions in lower limbs and median age of 23 years [16-47]. The expression of TLR2 and TLR4 in the epidermis of normal skin was high. When compared with normal skin, TLR2 and TLR4 showed lower expression in the epidermis. There was no expression of TLR9 in the epidermis in cases of cutaneous leishmaniasis and normal skin. The mean number of cells expressing TLR2 in the dermis was 136.36 ± 82.46 cells/mm², while the average of cells expressing TLR4 was 3.21 ± 4.11 cells/mm². The count of TLR9 was 86.15 ± 88.36 cells/mm², and it was found mainly in the areas of granuloma formation. Linear regression showed no relationship between the number of labeled cells or cytokines with TLR2 or TLR4. There was an association between TLR9 and two cytokines (IL-12 and IL-4). This correlation suggested that the proportional increase in the expression of TLR9 was related to greater expression of IL-12 and IL-4 ($p < 0.05$). The double staining showed that macrophages and endothelial cells expressed TLR2. The double staining showed no expression of TLR2 in dendritic cells and NK cells. **Conclusion:** The localized cutaneous leishmaniasis associated with the presence of TLR2, TLR4 and TLR9. The expression of TLR2 in the dermis was statistically greater than that of TLR4 and TLR9, which is expressed by macrophages. The expression of TLR9 occurs primarily in the areas of granulomas was associated with the expression of IL-12 and IL-4.

Descriptors: 1. *Leishmania*; 2. Leishmaniasis, cutaneous; 3. Toll-like receptors; 4. Immunohistochemistry

1. INTRODUÇÃO

A resposta imune contra os diversos microrganismos é classificada em resposta inata e adaptativa. Os microrganismos que entram em contato com os macrófagos podem ser fagocitados, permitindo, após seu processamento, a apresentação dos antígenos para os linfócitos T (Hoffmann et al., 1999). Didaticamente, a resposta imune inata inicia desde este contato do microrganismo até a apresentação dos seus antígenos para os linfócitos. A partir deste ponto inicia-se a resposta imune adaptativa. O início da resposta imune só ocorrerá se o macrófago identificar o microrganismo como algo não próprio do ser humano. Para isso são necessários receptores presentes na superfície da membrana das células humanas que reconheçam os patógenos como estranhos. Estes receptores são chamados de receptores de reconhecimento padrão, do inglês *pattern-recognition receptors* (Gordon, 2002). Estes receptores reconhecem moléculas estáveis (que não sofrem mutações) presentes em todos os agentes infecciosos. Este grupo de moléculas estáveis é chamado de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (Ozinsky et al., 2000). Estas moléculas não são encontradas nos humanos, e assim, os receptores de reconhecimento padrão reconhecem as PAMPs, funcionando como um perfeito mecanismo de identificação do que é próprio e do que não é próprio.

Exemplos destas PAMPs são o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram-negativas, o peptidoglicano na parede celular de bactérias gram-positivas e o ácido teicóico em diversos fungos (Gazzinelli et al., 2006). Certos fragmentos de ácidos nucléicos constituídos por repetições de citosina e guanina também podem ser reconhecidos como PAMPs (Shah et al., 2003).

As PAMPs reconhecidas pelos receptores de reconhecimento padrão levam à ativação de uma cascata de reações intracelulares que promoverão a síntese de citocinas. As

citocinas são fundamentais para atrair outras células, gerar a resposta inflamatória, permitir o desenvolvimento da resposta imune adaptativa eficiente e, com todos estes elementos, eliminar o microrganismo invasor. Parte dos receptores de reconhecimento padrão é responsável pela fagocitose, e outra parte é responsável pela sinalização que levará à produção de citocinas. Entre os receptores de reconhecimento padrão que podem desencadear a produção de citocinas está o *toll-like receptor* (TLR). Este receptor foi descoberto durante estudos com *Drosophila*, que mostraram a eficiente resposta imune deste inseto (Medzhitov et al., 1997b). Durante os estudos foi descoberto um receptor que reconhecia fragmentos de bactérias, fungos ou vírus e iniciavam a resposta imune do inseto. Este receptor mudou alguns conceitos da resposta imune, pois se acreditava que a produção de citocinas só ocorria após a fagocitose. Isto levou os pesquisadores a procurar algo similar nos seres humanos. Foi durante esta busca que descobriram o primeiro homólogo da família dos TLRs em humanos, que foi denominado de TLR4 (Medzhitov et al., 1997b). Posteriormente, mais de 10 tipos foram identificados, cada um com uma especificidade para diferentes PAMPs (Medzhitov et al., 2000).

Na última década, os TLRs têm recebido importante atenção pelo fato de reconhecerem o LPS das bactérias Gram-negativas e iniciarem o processo de sepse (Qureshi et al., 1999). Os estudos mostraram claramente a relação da ativação do TLR4 com o quadro séptico, mediado através da produção de citocinas inflamatórias. Em paralelo, estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar a função dos TLRs em doenças parasitárias.

A infecção cutânea causada pela *Leishmania major* é um dos modelos de resposta imune mais estudado. Em camundongos, esta leishmaniose pode demonstrar os dois pólos da resposta imune adaptativa, o padrão Th1 e o padrão Th2. Na resposta Th1 ocorre uma produção adequada de IL-12 com apresentação antigênica para linfócitos T, produção de

IFN- γ , ativação de macrófagos e eliminação da leishmânia. Por outro lado, na resposta Th2, mesmo com apresentação antigênica, ocorre produção de IL-4 e IL-10, manutenção do parasito no tecido e progressão da doença (Holaday et al., 1991). Apesar do conhecimento do padrão de imunidade adaptativa Th1 e Th2, os fatores que direcionam para cada um destes padrões de resposta imune ainda são desconhecidos.

Alguns autores sugerem que a resposta imune inata determina o padrão de resposta imune (Scharton-Kersten et al., 1995; Hondowicz et al., 1999). Por este motivo, alguns estudos em modelos experimentais de leishmaniose foram realizados para determinar a função dos TLRs na indução e padrão da resposta imune.

Dentre os TLR, os receptores TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 foram os mais estudados. Esses estudos avaliaram modelos animais (*in vivo*) e estudos *in vitro* (de Veer et al., 2003; Becker et al., 2003; Debus et al., 2003; Poltorak et al., 2000; Muller et al., 1997; Kropf et al., 2004a; Li et al., 2004; Puig et al., 2006; Lange et al., 2004; Flandin et al., 2006). Os resultados encontrados nesses estudos foram controversos. Alguns demonstraram que o bloqueio de uma fração comum a todos os TLRs gerava uma diminuição de IL-1, IL-12 e IFN- γ , assim como aumento de IL-4 (Hawn et al., 2002; Muraille et al., 2003; Debus et al., 2003; de Veer et al., 2003). A consequência disso foi o aumento do número de células parasitadas e aumento do número de lesões cutâneas nos modelos animais. Quando foram avaliados os receptores individualmente, verificou-se o mesmo padrão em TLR2 e TLR4 (Kropf et al., 2004a). Porém, outro estudo mostrou que a inibição do TLR4 não aumentava o número de lesões (Antoniazzi et al., 2004). Li et al. demonstraram que a estimulação dos receptores TLR9 promovia aumento de IL-18 e de IFN- γ (Li et al., 2004).

Todos os estudos experimentais *in vitro* ou *in vivo* de TLRs utilizaram espécies de *Leishmania* não encontradas no Brasil. Nenhum destes modelos avaliou a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, o principal agente etiológico da leishmaniose cutânea

no Brasil. Da mesma forma, não temos estudos na literatura abordando a expressão dos TLRs na leishmaniose de seres humanos.

2. OBJETIVOS

Considerando a importância dos TLRs na resposta imune da doença cutânea pela leishmânia, a ausência de estudos com *L. (V.) braziliensis*, e também a ausência de estudos em humanos comprovando a expressão destes receptores nas lesões, este trabalho tem como objetivo geral demonstrar a presença dos principais TLR em lesões de pele humana causadas por *L. (V.) braziliensis*.

Os objetivos específicos são:

- 1) comparar a expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 na leishmaniose cutânea com o tecido normal;
- 2) determinar as principais células que expressam os TLRs, mediante dupla-marcação para macrófagos, células NK, células dendríticas e células endoteliais;
- 3) quantificar a expressão de citocinas (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ), células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas), linfócitos (CD4 e CD8) e células NK para determinar uma associação entre a quantidade de células e a expressão de TLRs.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Parasito e formas clínicas

A expressão “leishmaniose” corresponde a um grupo de doenças causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. A leishmaniose acomete o homem e diversos mamíferos selvagens, assim como os seus vetores (dípteros e hemípteros). O principal vetor responsável pela transmissão da leishmaniose no Novo Mundo é o flebótomo do gênero *Lutzomyia*, com mais de 25 espécies presentes na América do Sul (Killick-Kendrick, 1999). Quando ambos (vetor e hospedeiro) pertencem ao meio silvestre, classificamos a leishmaniose como uma zoonose e, quando a doença acomete o homem por meio da sua invasão no ambiente selvagem, denominamos de antroponose. Nos últimos anos a incidência da doença tem aumentado e houve mudança no padrão de transmissão em algumas regiões do mundo. Na Índia, por exemplo, a transmissão ocorre de homem para homem mediante o vetor, caracterizando uma antroponose (Kerr, 2006; Tuon et al., 2008d).

A leishmânia é um parasito intracelular obrigatório, transmitido através da picada do flebótomo, que se multiplica nas células do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos suscetíveis. Este microrganismo apresenta duas formas estruturais: amastigota e promastigota. A forma promastigota habita o segmento anterior do tubo digestivo do flebótomo, a qual é inoculada durante a picada (Larson et al., 1987; Marsden, 1986). A forma amastigota é a forma presente dentro dos macrófagos dos animais infectados.

Logo após entrarem na pele, as promastigotas aderem à superfície do macrófago e são fagocitadas. Dentro do vacúolo parasitóforo dos macrófagos as promastigotas perdem o

flagelo e transformam-se em formas amastigotas, as quais se multiplicam por divisão binária. Neste momento inicia-se a doença leishmaniose, cuja evolução dependerá de características do hospedeiro e da espécie infectante de *Leishmania*.

A leishmaniose é classificada em visceral ou tegumentar. Além de diferenças clínicas, estas duas formas são causadas por espécies diferentes de *Leishmania*. A leishmaniose visceral causa uma doença crônica e com comprometimento do sistema reticuloendotelial levando a hepatomegalia e esplenomegalia associado com pancitopenia, configurando um quadro sistêmico que pode levar a morte. Por outro lado, a leishmaniose tegumentar tende a ser uma doença localizada, embora possa ocorrer em raros casos o acometimento difuso da pele e de mucosas. Devido estes diferentes aspectos clínicos da doença, a leishmaniose tegumentar é dividida em cutânea localizada, cutânea difusa e mucosa.

A leishmaniose tegumentar ainda é classificada conforme a região em leishmaniose do Velho Mundo ou do Novo Mundo, sendo que neste o nome mais utilizado é leishmaniose tegumentar americana. A distinção se dá pelas diferenças clínicas, vetores e espécies de *Leishmania*.

3.2 Epidemiologia e espécies da leishmaniose tegumentar americana

A leishmaniose tegumentar está amplamente distribuída pelo mundo, ocorrendo na Ásia, Europa, África e Américas, apresentando diferenças em aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos, decorrentes dos diversos ecossistemas.

Na América Latina as espécies são diferentes daquelas descritas no Velho Mundo (África, Ásia e Europa). A leishmaniose tegumentar americana no Brasil pode ser causada por várias espécies, mas três delas são as mais prevalentes: *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Viannia) braziliensis*.

Os roedores são os principais reservatórios da *L. (L.) amazonensis*. Esta espécie está relacionada com um ciclo silvestre de transmissão para o homem, cuja distribuição ocorre desde o interior do Estado da Bahia, passando pelo norte de Minas Gerais e Goiás e então para toda a região norte do país. A doença tem características diferentes daquelas apresentadas por outras espécies, lembrando que o flebótomo transmissor difere também entre as espécies (Vasconcelos et al., 1988).

A *L. (V.) guyanensis* também apresenta um ciclo selvagem, sendo o tamanduá, o bicho preguiça e o rato do mato os principais hospedeiros. A doença ocorre em todos os Estados da região Norte do Brasil. Nos países localizados ao Norte do Brasil, a *L. (V.) guyanensis* é a espécie mais comum, embora possa ocorrer sobreposição de casos com a *L. (L.) amazonensis* no Suriname e Guiana, locais com maior incidência desta espécie (Banuls et al., 1999; Floch, 1954; Romero et al., 2001; Romero et al., 2002; Tojal da Silva et al., 2006).

A *L. (V.) braziliensis* apresenta distribuição mais ampla que as outras espécies, promovendo doença desde a Bahia até o norte do Estado do Paraná, passando por Minas Gerais, interior de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo (Abramson et al., 1995; Barral et al., 1991; Corredor et al., 1990; Cuba-Cuba et al., 1991; Ishikawa et al., 2002). Áreas da região amazônica também são acometidas, incluindo o Estado do Pará. É a espécie mais importante no Brasil e é a principal espécie causadora da forma mucosa de leishmaniose.

3.3 Patogenia

No momento da picada do flebótomo, ocorre entrada de promastigotas na pele e uma resposta imune é iniciada. O estímulo nervoso desencadeado pelo aparelho sugador do flebótomo estimula o sistema neuroendócrino, liberando neuropeptídeos que atraem

células inflamatórias para o local da picada, principalmente macrófagos e neutrófilos (Ahmed et al., 2001; Ahmed et al., 1999; Ahmed et al., 1998b; Ahmed et al., 1998a; Jakob et al., 1999; Ruiz et al., 2003). Antes mesmo do contato com os macrófagos, as promastigotas podem sofrer ação lítica pelo complemento, por anticorpos inespecíficos e também por produtos oxidativos dos neutrófilos (Blackwell et al., 1985; Dominguez et al., 2002; Guy et al., 1993; Hawlisch et al., 2005; Jacobs et al., 2005; Mosser et al., 1985a; Mosser et al., 1985b; Mosser et al., 1986; Mosser et al., 1987; Puentes et al., 1989; Russell et al., 1988). Entretanto, uma vez aderidas à superfície do macrófago, as promastigotas são fagocitadas, perdem o flagelo dentro do vacúolo parasitóforo e transformam-se em amastigotas, onde se multiplicam por divisão binária. O parasito tem uma alta atividade enzimática que degrada metabólitos oxidativos tóxicos produzidos pelo macrófago, além de ser altamente adaptável ao pH ácido do fagolisossoma. Assim, as amastigotas podem sobreviver e se multiplicar no interior dos vacúolos fagocíticos.

Além dos macrófagos, as células dendríticas presentes na derme e epiderme também podem internalizar a leishmânia utilizando outros receptores, assim como outros mecanismos de destruição intracelular.

O macrófago parasitado pode apresentar os antígenos das leishmânia que foram destruídas aos linfócitos T CD4⁺ (Bertho et al., 2000; Costa et al., 2003; Das et al., 1999; Gollob et al., 2005; Heinzl, 1994). Caso ocorra expansão preferencial de linfócitos T CD4⁺ do subtipo Th1, haverá produção de citocinas que apresentam um padrão inflamatório (IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-2) levando à ativação dos macrófagos e destruição dos parasitos. Esta via de ativação geralmente leva a um processo inflamatório intenso e posterior resolução do processo infeccioso (Akuffo et al., 1999; Bacellar et al., 2000; Hernandez et al., 2006; Huang et al., 1998). Por outro lado, se a resposta for do padrão Th2 (IL-4 e IL-10) permitirá que, dependendo da espécie, a leishmânia escape do local de

inoculação e ocorra disseminação local (leishmaniose cutânea difusa) ou para outros órgãos (leishmaniose visceral) (Ahuja et al., 1999; Bacellar et al., 2000; Murray et al., 2006; Wilson et al., 2002). Se a resposta imune fosse toda polarizada para um padrão Th1 não haveria o desenvolvimento de doença. Porém, na forma cutânea localizada da leishmaniose tegumentar americana existe quantidade abundante de ambos os padrões de citocinas, embora prevaleçam citocinas Th1 (Tapia et al., 1994). Todo o processo imune gera um infiltrado inflamatório que promove a formação da úlcera cutânea. Diferentes espécies de *Leishmania* geram diferentes padrões inflamatórios, levando a diferenças particulares entre as úlceras nas diversas partes do mundo e de paciente para paciente (Xavier et al., 2005). Na figura 1 está didaticamente demonstrada a resposta imune na leishmaniose cutânea.

Figura 1 – Esquema simplificado da resposta imune na leishmaniose cutânea até a formação da úlcera cutânea.

Na forma cutânea difusa existe uma predominância de resposta Th2 durante toda a doença, o que leva ao processo crônico não ulceroso. A forma disseminada da doença ocorre em pacientes com deficiência imune celular, onde existe uma pobreza de resposta Th1 e facilita a disseminação do parasito pela pele, assim como pode levar a visceralização. A diferença da forma difusa está na quantidade e espécie de leishmânia no tecido, sendo pobre na disseminada e abundante na difusa (Tuon et al., 2007).

3.4 Reconhecimento da leishmânia pelo sistema imune

O reconhecimento do parasito pelas células apresentadoras de antígenos, seja macrófago ou célula dendrítica (DC), sempre foi questão de discussão (Locksley et al., 1988; Blank et al., 1993). A maioria dos trabalhos considera que a entrada seja principalmente por receptores de imunoglobulinas e parte por receptores CR3 (Blank et al., 1993; Woelbing et al., 2006). Assim, o parasito só entraria nas células após estarem opsonizados por fatores do complemento (CR3) ou por imunoglobulinas não específicas. Por estes mecanismos o parasito adentra a DC ou macrófago tanto na forma promastigota como amastigota. Foi recentemente descoberto que a internalização de amastigotas também é mediada por receptores de imunoglobulinas, Fc γ RI e Fc γ RIII (Woelbing et al., 2006). Após a internalização das amastigotas, a DC promove expressão dos antígenos para as células T através dos receptores de histocompatibilidade tipo II (MHC II) e desencadeia-se uma resposta adaptativa mediante intensificação da produção de citocinas inflamatórias. Isto se deve, em parte, à baixa capacidade da DC em capturar a forma de promastigota, função principal do macrófago. Alguns modelos tentaram demonstrar que a leishmânia poderia invadir a célula dendrítica por endocitose na ausência de

imunoglobulina. Isto parece possível e conseguiu-se demonstrar que o parasito pode utilizar um receptor específico, o CD209. O CD209 é mais conhecido como DC-SIGN (*DC-Specific Intercellular adhesion molecule (ICAM)-3-Grabbing Nonintegrin*) (Caparros et al., 2005).

Os mecanismos acima descritos são cruciais para gerarem a resposta imune ao parasito, mas dependem da fagocitose do microrganismo. Porém, com a descoberta dos receptores *toll-like*, o início da resposta inflamatória poderia ocorrer antes mesmo da fagocitose. Além disso, a ativação dos TLRs poderia influenciar na destruição intracelular do parasito, permitindo uma resposta inflamatória inicial mais eficaz.

3.5 Receptores *toll-like*

O primeiro membro da família de TLRs foi uma proteína identificada em *Drosophila* implicada no desenvolvimento embrionário deste inseto (Hashimoto et al., 1988). Gay e Keith foram os primeiros que perceberam que o receptor *toll* de *Drosophila* apresentava similaridades com o receptor de IL-1 humano (Gay et al., 1991). Assim como o *toll*, o receptor de IL-1 gera uma cascata de sinalizações intracelulares promovendo a ativação do fator nuclear de transcrição (NF- κ B). Porém, foi em 1998 que Poltorak et al. descobriram que mamíferos também expressavam TLR durante estudos com camundongos em modelos de sepse (Poltorak et al., 1998).

Os TLR são proteínas conservadas durante a evolução das espécies, caracterizadas por um domínio extracelular de sequências repetidas contendo leucina e um domínio intracelular denominado de *toll/IL-1 receptor-like* (TIR) (Medzhitov et al., 1997a). Os TLR reconhecem moléculas específicas (PAMPs) presentes nos microrganismos, permitindo que o nosso sistema imune identifique o que é próprio do não próprio. O mecanismo pelo qual o domínio extracelular do TLR reconhece o próprio do não próprio

ainda não está esclarecido. Além disso, cada TLR pode reconhecer diversos ligantes sem qualquer similaridade estrutural, dificultando a compreensão da interação deste receptor com as PAMPs. Na porção intracelular, o TLR está ligado a uma proteína sinalizadora denominada de MyD88.

A ligação de uma PAMP ao TLR leva a autofosforilação da proteína sinalizadora MyD88 integrada a uma proteína quinase conhecida como IRAK. Esta enzima leva a oligomerização de outra proteína denominada de TRAF6. A oligomerização da TRAF6 ativa a TAK-1, membro da família de MAP-3 quinases, levando a ativação de quinases I κ B. Estas quinases fosforilam I κ B, levando a proteólise e formando NF- κ B, o qual migra para o núcleo da célula (Anderson, 2000). Existem vias alternativas após a oligomerização da TRAF6, tornando parte das reações ainda não completamente compreendidas. A figura 2 demonstra de forma resumida a cascata de reações desencadeadas pelos TLRs.

Figura 2 – Figura mostrando resumidamente a resposta intra-celular após a ativação dos receptores *toll-like*.

As citocinas não estão armazenadas no meio intracelular, precisando ser sintetizadas para a sua eliminação no extracelular a partir de um estímulo inflamatório. O estímulo para a produção das citocinas depende da translocação do NF- κ B para o núcleo. No núcleo, o NF- κ B liga-se a sequências específicas de bases que ativam a transcrição de RNA mensageiro para posterior síntese das citocinas. As citocinas induzidas por esta via são TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-8 e IFN- γ (Blackwell et al., 1997).

Até o momento existem 10 TLRs descritos em humanos. Os TLRs apresentam a capacidade de reconhecer as PAMPs de acordo com o substrato. Eles podem reconhecer peptídeos (TLR5), fragmentos lipídicos (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6) ou sequências de oligonucleotídeos (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). O TLR1 e o TLR6 não atuam isoladamente. Eles formam um dímero com o TLR2 para que ocorra a produção de citocinas. A ligação destes TLRs não significa que eles atuem totalmente com a mesma resposta do TLR2. Existem evidências que a via de sinalização seja diferente quando os dímeros TLR2-TLR2, TLR2-TLR1 e TLR2-TLR6 são ativados, mas todos levam a uma resposta dirigida pela via de estímulo do MyD88, culminando na formação do NF- κ B.

Alguns TLRs estão presentes na membrana plasmática e outros localizados em endossomos intracelulares. Os receptores que reconhecem peptídeos e derivados lipídicos estão presentes na superfície celular, ao passo que aqueles que reconhecem fragmentos de DNA, estão localizados no meio intracelular. Isto se deve ao fato que os fragmentos de DNA aparecerão após a digestão do patógeno nos vacúolos citoplasmáticos.

3.6 Receptores *toll-like* e *Leishmania*

3.6.1 Leishmânia ativa TLR?

Alguns protozoários são parasitos humanos e são reconhecidos pelo sistema imune como não próprios. Desta forma, especula-se que o seu reconhecimento poderia ser feito pelos TLRs. Estudos já demonstraram que os TLRs reconhecem antígenos de *Plasmodium* (malária), *Toxoplasma* (toxoplasmose) e *Trypanosoma* (doença de Chagas) (Gazzinelli et al., 2004). Assim, seria muito provável que antígenos de leishmânia também poderiam ser reconhecidos pelos TLRs, uma vez que pertence a mesma família do *Trypanosoma* (Mun et al., 2003; Scanga et al., 2002; Adachi et al., 2001; Campos et al., 2001; Kedzierski et al., 2004). O primeiro estudo com este intuito foi realizado em camundongos no ano de 2002 (Hawn et al., 2002). Este autor demonstrou que a *L. major* estimulava a porção comum a todos os TLRs (MyD88) levando a transcrição da citocina IL-1, mas não de IL-10, IL-6, IL-8 ou ELAM (*endothelial leukocyte adhesion molecule*).

Um ano depois, dois estudos demonstraram que a inibição de MyD88 em modelo de leishmaniose com camundongos promovia disseminação da doença e morte. Isto foi associado à baixa produção de IFN- γ e IL-12, e níveis elevados de IL-4. Os dados sugeriram que a leishmânia ativaria algum TLR, levando a um padrão de resposta inflamatória. (Muraille et al., 2003; Debus et al., 2003; Anderson, 2000).

3.6.2 Qual TLR está envolvido no reconhecimento da leishmânia?

Todos os TLRs são expressos nos macrófagos quando ativados por IFN- γ (Flandin et al., 2006). Porém, não são todos os TLRs que reconhecem os antígenos de *Leishmania*. Os artigos publicados até então têm mostrado que o TLR2 é um dos mais importantes no reconhecimento das leishmânias (Becker et al., 2003; de Veer et al., 2003; Flandin et al., 2006).

Outros estudos também demonstraram que TLR9 é importante receptor no reconhecimento de porções do DNA de *Leishmania* (Puig et al., 2006; Lange et al., 2004; Flynn et al., 2005). O TLR3 foi estudado em um único trabalho com *L. donovani* (relacionada com a leishmaniose visceral), revelando que este receptor seria importante na produção de TNF- α e óxido nítrico apenas em macrófagos previamente ativados por IFN- γ (Flandin et al., 2006).

É possível que o TLR4 também possa reconhecer antígenos de *L. major* (Hawlish et al., 2005; Kropf et al., 2004a; Kropf et al., 2004b), mas um estudo sugeriu que este receptor seria de pouca importância para a leishmaniose (Antoniazi et al., 2004).

De Veer et al. demonstraram que o lipofosfoglicano presente na superfície da leishmânia estimulava apenas o TLR2, mas não outros TLRs testados (TLR1, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR9) (de Veer et al., 2003). Considerando que o TLR1 e TLR6 estão ligados ao TLR2, podemos afirmar até o momento que faltam estudos com TLR5, TLR7 e TLR8.

3.6.3 Qual célula expressa TLR na leishmaniose?

Tendo conhecimento que a *Leishmania major* ativa os TLR2, TLR4 e TLR9, a próxima questão é qual a célula que faria o reconhecimento do parasito por meio destes receptores. Um estudo com células dendríticas demonstrou que a via comum dos TLRs (MyD88) é ativada, mas não foi avaliado qual TLR estaria envolvido com o reconhecimento (De Trez et al., 2004). O macrófago foi a célula mais estudada na interação leishmânia e TLR. Diversos trabalhos demonstraram que o macrófago reconhece a leishmânia através de TLR2, TLR4 e TLR9 (de Veer et al., 2003; Flandin et al., 2006; Kropf et al., 2004b; Kropf et al., 2004a). A expressão de TLR2 pela célula NK na leishmaniose foi demonstrado em um estudo, justificando a importância desta célula na

resposta imune inata (Becker et al., 2003). Não temos ainda estudos com outras células na leishmaniose.

3.6.4 Qual antígeno da leishmânia é reconhecido pelo TLR?

A leishmânia apresenta diversos componentes em sua superfície que poderiam funcionar como PAMPs para serem reconhecidos pelos TLR. A quase totalidade das moléculas de superfície está ancorada na membrana celular através de um componente composto por fosfatidil-inositol glicosilado. A partir daí, radicais de oligonucleotídeos ou lipoglicídeos se ligam e são responsáveis pela formação da parede externa do protozoário. As moléculas mais estudadas são o lipofosfoglicano (LPG), a glicoproteína 63 (gp63), o glicoinositolfosfolípídeo (GIPL) e o peptideofosfoglicano (PPG) (McConville et al., 1993).

O LPG é responsável por mais de 95% na constituição da superfície da leishmânia, tornando este derivado lipídico um grande candidato como PAMP para os TLR. A quantidade deste antígeno pode variar entre as espécies de *Leishmania* e entre as formas amastigotas e promastigotas. Esta característica de expressão antigênica pode influenciar o padrão de resposta imune (McConville et al., 1995; Spath et al., 2003).

A gp63 é outra glicoproteína presente nas formas amastigotas que também tem papel como antígeno da *Leishmania* (Yao et al., 2003; Chaudhuri et al., 1989; McMaster et al., 1994; Mosser et al., 1997; Matlashewski, 2001).

As demais moléculas são glicolípídeos constituídas por sequências de galactose e manose fosforiladas (Gal- β -1,4Man-PO₄) cuja quantidade destes elementos varia entre as diversas moléculas.

O LPG estimula a transcrição de RNA mensageiro promovendo aumento da expressão de TLR2 em macrófagos (Becker et al., 2003). Além disso, o LPG aumenta a produção de IFN- γ e TNF- α através da ligação com o TLR2. O TLR2 reconhece outros

antígenos que tenham semelhança com o LPG, desde que contenham o radical Gal- β -1,4Man-PO⁴ (Flandin et al., 2006). Estudo com outras moléculas sem Gal- β -1,4Man-PO⁴, como o GILP, gp63 e o PPG, não estimularam o TLR2 (de Veer et al., 2003).

Um estudo que avaliou a interação do LPG com todos os TLRs demonstrou que o único receptor capaz de desenvolver uma cascata de reações intracelulares foi o TLR2. Este trabalho sugeriu que, se outro TLR for ativado pela leishmânia, outra molécula de superfície deveria ser estudada, que não o LPG (de Veer et al., 2003).

Um estudo com *L. donovani* revelou que o TLR3 era ativado *in vitro*, mas não conseguiu identificar um antígeno para este TLR, uma vez que ele reconhece porções específicas de dsDNA. Esse trabalho chegou a sugerir a possibilidade de um vírus DNA presente na leishmânia para justificar a ativação, mas as hipóteses foram especulativas (Flandin et al., 2006).

A importância do TLR4 na leishmaniose é questionável. Modelos animais demonstraram que a inibição do TLR4 aumentava o número de lesões (Kropf et al., 2004b; Kropf et al., 2004a). Por outro lado, estudo *in vitro* não demonstrou esse fato (Antoniazzi et al., 2004). Para resolver esta dúvida, dois estudos publicados em 2009 compararam a produção de óxido nítrico pela estimulação de TLR2 ou TLR4 com LPG (Kavoosi et al., 2009b). Estes estudos concluíram uma menor importância do TLR4 (Kavoosi et al., 2009b; Kavoosi et al., 2009a).

Embora o LPG não tenha mostrado relação com o TLR4, trabalho *in vitro* com PPG de *L. pfanoi* demonstrou que este antígeno pode funcionar como ligante para o TLR4, porém a quantidade desta molécula na superfície da leishmânia é escassa (Whitaker et al., 2008). Ribeiro-Gomes et al. demonstraram que produtos de neutrófilos podem ativar TLR4 na leishmaniose, justificando a sua ativação em modelos animais assim como a não expressão em modelos de células *in vitro* (Ribeiro-Gomes et al., 2007).

4. MÉTODOS

4.1 Casuística

De um total de 100 biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, 12 casos foram selecionados para a realização deste estudo. Os pacientes eram provenientes da cidade de Santarém no Estado do Pará cujas biópsias foram colhidas no período de Janeiro de 2002 a Janeiro de 2004.

O diagnóstico de leishmaniose cutânea baseou-se nos dados clínicos dos pacientes, teste de Montenegro positivo, presença de formas amastigotas em raspado da lesão, presença de amastigotas em exame histopatológico e também positividade de antígenos de leishmânia através de exame de imunoistoquímica. Os pacientes deveriam apresentar todos estes critérios para inclusão no estudo para diminuir a heterogeneidade da amostragem.

Foram usados como controle quatro casos de biópsia de pacientes com distribuição etária equivalente aos casos de leishmaniose, sem processos infecciosos, sem sinais de dermatopatia crônica ou aguda e sem alterações histológicas da pele, provenientes do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram utilizadas amostras teciduais com representatividade e sem evidências de autólise. Além disso, as biópsias de pele deveriam conter epiderme e derme com dimensões suficientes para realização de contagem das células.

Para a confirmação da espécie de *Leishmania* foi realizada a amplificação de ácidos nucléicos por técnica de reação em cadeia da polimerase no material biopsiado. Foram

avaliados apenas os casos que demonstraram *Leishmania (V.) braziliensis* pela técnica de amplificação de ácidos nucleicos.

Em todos os casos foram afastadas outras dermatoses mediante avaliação criteriosa da microscopia do corte do tecido, e descartados os casos onde houve dúvida quanto à concomitância de outro diagnóstico.

4.2 Área

Os pacientes com suspeita de leishmaniose cutânea foram atendidos no Centro Ambulatorial de Leishmaniose na cidade de Santarém. Esta cidade está localizada na latitude 2°26'6.64"S e longitude 54°42'4.04"W, 36 metros acima do nível do mar e área de 24.254 km². A população da cidade é de 278.118 habitantes e uma estimativa de 80.000 habitantes na região rural (8, 9). O clima é quente e úmido, com temperatura variando entre 25°C e 28°C. A pluviosidade media é de 1.920 mm (8).

4.3 Aspectos éticos

Todos os pacientes atendidos no ambulatório procuraram o serviço espontaneamente, não houve busca ativa. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – no. 0913/07).

O presente estudo utilizou amostras de pele proveniente de pacientes inseridos em um protocolo desenvolvido pelo Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Secretaria Municipal de Santarém. Neste estudo foi apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido para a realização da biopsia.

4.4 Pacientes e testes

Dados clínicos obtidos dos pacientes foram: 1) idade; 2) gênero; 3) número de lesões e; 4) tempo de evolução da doença. Após termo de consentimento, todos os pacientes foram submetidos ao raspado da lesão, biópsia e teste de Montenegro.

O teste de Montenegro foi realizado através da inoculação intradérmica de leishmanina proveniente de *L. (L.) amazonensis* (OMS MHOM/BR/73/M2269 - CPPI, Piraquara, PR, Brasil). A área da resposta cutânea foi medida em milímetros após 48 horas.

O diagnóstico por escarificação foi realizado na borda da lesão ulcerada mais recente, sem secreção purulenta, ou na superfície da lesão não ulcerada, utilizando-se uma lâmina de bisturi estéril. Após a escarificação foi realizado esfregaço em lâmina e corado pela técnica de Giemsa. Os preparados assim obtidos foram examinados diretamente com o microscópio óptico para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania*.

4.5 Exame histopatológico

Foram realizadas biópsias da borda da lesão, acondicionadas em formol tamponado (10%) e encaminhadas para o Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram feitos cortes com 4 µm de espessura. Coloração para exame histopatológico com hematoxilina & eosina foi realizada para análise das alterações histológicas, triagem das amostras para exame de imunoistoquímica e identificação de formas amastigotas. Coloração com Giemsa foi utilizada para identificação e contagem de mastócitos.

4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Leishmania (V.) braziliensis*

Biópsias obtidas da borda da lesão foram usadas para a realização da PCR. O material foi armazenado em uma solução tamponada de 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, e 100 mM Tris em pH 7,5. As amostras foram posteriormente lavadas em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) para lise. Proteinase K foi adicionada na solução em concentração de 200 ng/mL e o lisado ficou em incubação por 2 horas a 42°C. Após extração orgânica com fenol-clorofórmio, o DNA (ácido desoxirribonucléico) foi precipitado mediante adição de 2,5 volumes de etanol absoluto e o precipitado foi dissolvido em 10 mM Tris, pH 7,4, e 1 mM EDTA (*TE buffer*).

A reação da polimerase para identificação de *Leishmania (V.) braziliensis* foi aplicada nas amostras usando iniciadores (*primers*) provenientes da glicose-6-fosfato desidrogenase do parasito.

Os iniciadores, a técnica de amplificação e revelação foi descrita anteriormente (Uliana et al., 1994). Uma primeira PCR foi realizada para a triagem e detecção de DNA de leishmânias do subgênero *Viannia*, utilizando os iniciadores ISVC 5' (ATC-ACA-ATG-ATG-GTC-AAC-GCA) e ISVA 5' (GTC-GGT-TAT-CCT-ATT-CGG-GTC). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, corado em brometo de etídio.

Os produtos da PCR anterior foram submetidos a uma segunda PCR (semi-nested). Neste processo amplifica-se especificamente o DNA de *Leishmania (V.) braziliensis*. O objetivo é aumentar a sensibilidade do método devido ao aumento da quantidade de DNA amplificado pelos métodos consecutivos. Os iniciadores desta segunda reação foram ISVC 5' ATC-ACA-ATG-ATG-GTC-AAC-GCA) e ISVB 5' (TAC-TCG-CCA-TGT-CGG-AGG). O produto da PCR foi novamente submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, corado em brometo de etídio.

4.7 Imunoistoquímica e imunomarcção

4.7.1 Imunoistoquímica para identificação de antígenos de *Leishmania*

4.7.1.1 Preparo das lâminas

Cortes histológicos com 4 µm de espessura foram colocados em lâminas previamente tratadas com solução adesiva de 3-aminopropiltriethoxi-silano (SIGMA CHEMICAL CO., Saint Louis, USA, cód. A3648) e deixados em estufa a 60° C por 24h para melhor adesão dos cortes. As lâminas com cortes histológicos foram submetidas ao processo de desparafinização em xilol e hidratação em seqüência de álcool com concentração decrescente e água destilada. Posteriormente foram lavadas em PBS (*Phosphate Buffered Saline*).

4.7.1.2 Anticorpos primários

A peroxidase endógena dos tecidos foi bloqueada através da utilização da solução de água oxigenada 3% e submetendo as lâminas a três banhos de 10 minutos cada. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, água destilada e solução de PBS pH 7,4. As lâminas foram incubadas em tampão citrato 0,01M pH 6,0 pré-aquecido a 90°C por 20 minutos. Em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em tampão PBS pH 7,4. Para bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido, as lâminas foram incubadas com leite desnatado 10% por 30 minutos em temperatura ambiente.

A etapa seguinte consistiu na incubação dos espécimes com o anticorpo policlonal anti-*Leishmania* a 1% e mantidos em geladeira a 4°C por 18 horas. O anticorpo policlonal foi produzido em coelhos com *L. chagasi* e diluído em 1:800 em albumina BSA (SERVA, Heidelberg, Germany cód. 11930), gentilmente cedido pelo Professor Heitor Franco de Andrade Jr. (Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo).

4.7.1.3 Anticorpos secundários e cromógeno

A seguir os cortes foram lavados em tampão PBS por 5 minutos. Foi realizada a incubação com o anticorpo secundário marcado com biotina na diluição de 1:1000 por 30 minutos a 37°C. Posteriormente foram lavados em PBS duas vezes por 5 minutos.

O próximo passo consistiu na adição do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (DAKO, Glostrup, Denmark, cód. LSAB K690) por 30 minutos a 37° C com posterior lavagem dos cortes em PBS por duas vezes durante 5 minutos.

As reações foram reveladas com solução cromógena de diaminobenzidina (SIGMA CHEMICAL CO., Saint Louis, USA, cód. D5637) 0,03% acrescida de 1,2 mL de água oxigenada 3%. A intensidade de cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam cada reação. A etapa final consistiu na lavagem dos cortes em água corrente por 10 minutos, contra-coloração com hematoxilina de Mayer (DAKO, Carpinteria, USA, cód. S3309) por 10 segundos, lavagem em água corrente por 5 minutos, desidratação em concentrações crescentes de álcool e diafanização em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISCHER SCIENTIFIC, Fair Lawn, USA, cód. SP 15-100).

4.7.2 Imunomarcação para determinação do fenótipo das células inflamatórias

A imunomarcação para o fenótipo celular foi realizada utilizando anticorpos primários para CD68 (macrófagos), CD57 (células NK), CD4 (linfócitos TCD4), CD8 (linfócitos TCD8) e CD1a (células de Langerhans). Foram utilizados anticorpos anti-CD68 de camundongo diluído 1:50 (DAKO, Glostrup, Denmark, cód. M876), anti-CD57 de camundongo diluído 1:1000 (LABVISION, Fremont, USA, cód. MS136P), anti-CD1a de camundongo sem diluição (SEROTEC, Oxford, UK, cód. MCA1657), anti-CD4 de

camundongo diluído 1:1000 (DAKO, Glostrup, Denmark, cód. M834) e anti-CD8 de camundongo diluído 1:1000 (DAKO, Glostrup, Denmark, cód. M7103).

O preparo das lâminas, desparafinização e aplicação de anticorpos foram semelhantes à descrita para anticorpos de *Leishmania*.

Após a aplicação dos anticorpos secundários, o procedimento empregado para células de Langerhans (CD1a+), células CD4+ e CD8+ utilizou o sistema de amplificação de sinal denominado Catalyzed Signal Amplification System (CSA, DAKO Glostrup, Denmark, cód. K1500), objetivando a obtenção de melhores resultados na detecção. A revelação com solução cromógena foi descrita anteriormente na técnica para anticorpos anti-*Leishmania*.

4.7.3 Imunomarcacão para detecção de citocinas

Após desparafinização, hidratação e bloqueio da peroxidase endógena como descrito anteriormente, foi feita a recuperação antigênica com solução de tripsina 0,02% em PBS pH 7.4, durante 10 minutos a temperatura ambiente.

As lâminas foram lavadas em água destilada e em tampão PBS contendo saponina 0,1% (SIGMA CHEMICAL CO., Saint. Louis, USA, cód. S7900) durante 5 minutos. Foi feita incubação com leite desnatado 10% em água destilada por 30 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram então incubadas com anticorpos primários anti-TNF- α de cabra diluído 1:300 (R&D, Minneapolis, USA, cód. AF20NA) , anti-IFN- γ de camundongo diluído 1:200 (R&D, Minneapolis, USA, cód. MAB285), anti-IL-1 de cabra diluído 1:40 (R&D, Minneapolis, USA, cód. AF215NA), anti-IL-4 de cabra diluído 1:20 (R&D, Minneapolis, USA, cód. AB204NA), anti-IL-6 de cabra diluído 1:40 (R&D, Minneapolis, USA, cód. AF206NA), anti-IL-12 de cabra diluído 1:40 (R&D, Minneapolis, USA, cód. AB211NA), anti-IL-10 de camundongo diluído 1:40 (R&D, Minneapolis, USA, cód. MAB217) diluídos em BSA 1%, *over night* a 4°C.

Após essa etapa foi feita lavagem em PBS e saponina 0,1% duas vezes 5 minutos cada com posterior incubação com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de cabra ou camundongo durante 45 minutos a 37°C (conforme o anticorpo primário). Após nova lavagem em PBS com saponina 0,1% foi feito novo bloqueio de peroxidase endógena com três passagens de cinco minutos cada em solução de água oxigenada 3% e em seguida foi feita a lavagem em água corrente, água destilada em tampão PBS.

A incubação foi realizada com complexo SABC 1:1000 em PBS durante 30 minutos a 37°C. A revelação da reação foi feita como descrita anteriormente. Como controle positivo das reações para as diferentes citocinas foi utilizado corte histológico de linfonodo reativo.

4.7.4 Técnica de imunomarcção para determinação de receptores *toll-like*

A investigação dos TLRs na pele foi realizada por técnica imunoistoquímica conforme descrito anteriormente para marcação de fenótipos celulares. Foram utilizados anticorpos primários de coelho anti-TLR9 (ACRIS, Herfordt, Germany, cód. 26C593), e anticorpos primários de coelho anti-TLR2 (AMS Biotechnology, Abington, UK, cód. AP1502). Anticorpos de cabra monoclonais contra TLR4 humano foram adquiridos para a pesquisa deste receptor nos cortes histológicos (SANTA CRUZ, Santa Cruz, USA, cód. SC10741).

4.8 Estudos semiquantitativo e quantitativo

A contagem de células de Langerhans foi realizada na epiderme. A quantificação dos fenótipos celulares, expressão de citocinas e de TLRs foi realizada na derme. Todas essas avaliações foram feitas de forma quantitativa conforme descrito em outros estudos (Tuon et al., 2009; Tuon et al., 2008b; Tuon et al., 2008c; Duarte et al., 2008). Os cortes imunomarcados foram submetidos ao estudo quantitativo em que se padronizou para cada caso o exame aleatório de 12 campos de grande aumento na área da derme com ocular de

10 vezes, objetiva de 40 vezes e retículo graduado com 1cm^2 , cuja área equivale a $0,0625\text{mm}^2$ no tecido. Foi calculado o valor médio de células imunomarcadas por campo. Chegou-se ao número médio de células positivas por área dividindo-se esse valor médio pela área de $0,0625\text{mm}^2$.

A avaliação dos TLRs na epiderme foi realizada de forma semi-quantitativa. Imagens adquiridas através de câmera fotográfica acoplada ao microscópio foram utilizadas para comparar caso a caso. Classificamos a expressão de receptores em cada caso como nula, baixa, moderada ou alta.

4.9 Dupla marcação por imunoistoquímica

Reação imunoistoquímica de dupla marcação foi realizada para determinar quais células (macrófagos CD68+, células de Langerhans CD1a+, células NK CD57+ e células endoteliais CD34+) expressaram os TLRs avaliados. Essa reação baseou-se nos mesmos passos de uma reação imunoistoquímica convencional, já descrita anteriormente, apresentando apenas alguns diferenciais.

Inicialmente, realizamos as etapas da reação imunoistoquímica pesquisando-se todas as células descritas acima com a utilização de anticorpos específicos para cada célula, seguindo as etapas do protocolo de reação até a revelação com o DAB.

Após revelação com DAB, numa segunda etapa os cortes foram lavados em água corrente, água destilada e PBS, por cinco minutos cada, incubados com o anticorpo anti-TLR por 12 horas a 4°C . A etapa seguinte foi a aplicação nos cortes dos reagentes do “kit” LSAB + System-AP (DAKO, Carpinteria, USA, cód. K-0689), baseado em fosfatase alcalina, por 30 minutos a 37°C . A reação de fosfatase alcalina foi então revelada com o cromógeno *Liquid Permanent Red* (DAKO, Carpinteria, USA, cód. K-0640).

Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina de Mayer's (DAKO, Carpinteria, USA, cód. S3309) por cerca de um minuto, lavados em água corrente por cinco minutos e colocados para secar a temperatura ambiente. Os cortes foram montados em resina.

O resultado final seria a marcação das células em castanho e o TLR em vermelho ou ainda as células duplamente marcadas, demonstrando que essas células estariam expressando TLR.

4.10 Análise estatística

Os dados contínuos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Os dados semi-quantitativos foram classificados em alto, moderado, baixo ou nulo através de comparação direta de todos os casos entre si e alocados na classificação de maneira subjetiva.

Para comparação de valores quantitativos de cada grupo foi utilizado teste não paramétricos, sendo usado o teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para comparação entre os fenótipos celulares ou citocinas. A relação entre a quantidade de expressão de TLRs e do número de células expressas foi feita utilizando o teste de regressão linear. A correlação da quantidade de citocinas e célula com a de TLR foi realizada com o índice de correlação de Spearman. Foram consideradas significantes quando a probabilidade de igualdade era menor que 0.05 ($p < 0.05$). Todos os procedimentos estatísticos foram feitos utilizando o pacote estatístico Graph Pad Prism version 4.0 for Windows (GRAPH PAD SOFTWARE, San Diego, CA).

5. RESULTADOS

5.1 Descrição dos casos incluídos e excluídos

Do total de 100 casos iniciais, 16 pacientes apresentaram teste de Montenegro negativo e 25 esfregaços não demonstraram amastigotas no exame direto. Dentre os 59 casos restantes, em 19 não foram visualizados antígenos de *Leishmania* e 13 não preencheram critérios para análise adequada de epiderme e derme, cinco casos não apresentaram material suficiente para os cortes histológicos e 10 casos apresentaram outras espécies de *Leishmania* diferente da *L. (V.) braziliensis*. Doze casos foram incluídos neste estudo para análise e quantificação da expressão TLR, fenótipos celulares e expressão de citocinas. Todos os 12 casos expressavam antígenos para *Leishmania* na reação de imunoistoquímica (figura 3).

Figura 3 – Casos incluídos e excluídos no estudo de avaliação de receptores Toll-like em pacientes com leishmaniose cutânea

Todos os pacientes eram do sexo masculino com idade média de 24,91 anos e mediana de 23 [16 – 47] anos. O tempo médio de doença até a realização da biópsia foi de 76,66 dias e nenhum paciente recebeu tratamento prévio para leishmaniose. A mediana de tempo de doença foi 90 [30 – 120] dias (Tabela 1). Em todos os casos as lesões estavam presentes nos membros inferiores.

Todos os 12 casos apresentaram lesões causadas pela espécie *L. (V.) braziliensis* através da técnica de reação em cadeia da polimerase.

Tabela 1 – Características dos pacientes incluídos no estudo

Número do caso	Tempo de úlcera (dias)	Idade (anos)	Número de lesões	Reação de Montenegro (mm)
8	60	18	1	8
12	60	16	2	11
31	60	24	1	15
38	90	33	2	12
39	90	22	1	11
50	120	31	1	15
66	90	47	1	10
88	30	24	2	9
94	90	22	1	10
108	Sem dados	21	2	11
401	Sem dados	24	1	12
403	Sem dados	17	1	9

5.1.1 Fenótipos celulares

O aspecto microscópico da imunoistoquímica para as diversas células marcadas está representado na figura 4.

Figura 4 – Aspecto microscópico das diversas células marcadas por imunoistoquímica no tecido de pacientes com leishmaniose cutânea

A média de células marcadas pela imunoistoquímica no tecido dos pacientes com leishmaniose está descrita na tabela 2 e representada na figura 5.

Tabela 2 – Média da contagem de células que expressaram cada fenótipo celular e a expressão de TLR2, TLR4 e TLR9

Fenótipo Celular	Média (células/mm² ± desvio padrão)
CD4+	738,53±373,04
CD8+	225,05±198,16
CD68+	593,21±216,65
CD57+	11,98±9,52
CD1a+	24,05±16,09
Mastócitos	15,85±10,25
TLR2	136,36±82,46
TLR4	3,21±4,11
TLR9	86,15±88,36

Figura 5 – Média dos fenótipos celulares com expressão de receptores TLR2, TLR4 e TLR9 na derme

A comparação entre as diversas células expressas no tecido demonstrou que CD4+ foi superior à CD1a+, células NK (CD57+) e mastócitos ($p < 0.05$). A média de macrófagos

foi superior a de células dendríticas, células NK e mastócitos ($p < 0.05$). Entre as demais células não houve diferenças estatísticas.

5.1.2 Expressão de citocinas

A média de células expressando cada uma das citocinas analisadas está descrita na tabela 3 e representada na figura 6.

Tabela 3 - Média de células expressando citocinas em pacientes com leishmaniose cutânea

Citocinas	Média (células/mm ² ± desvio padrão)
IL-12	102,72±62,06
IL-4	95,40±68,08
IL-10	22,64±40,01
IL-1	8,44±9,78
IL-6	13,30±13,72
TNF- α	8,85±9,93
IFN- γ	17,67±18,21

Figura 6 – Média dos fenótipos celulares na derme de pacientes com leishmaniose cutânea

A expressão de IL-12 (citocina Th1) foi superior a de IL-10, TNF- α e IL-1 ($p < 0,05$). Já a expressão de IL-4 (citocina Th2) foi superior a de TNF- α e IL-1 ($p < 0,05$). A expressão de IL-10, IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ não foi superior à nenhuma outra citocina.

5.1.3 Expressão de TLR

Foi avaliada a expressão dos TLR2, TLR4 e TLR9 na epiderme e derme, incluindo o endotélio de vasos da derme.

5.1.3.1 Epiderme

A pele normal expressou TLR2, TLR4 e TLR9 na epiderme em quase totalidade das células. Conforme a análise semi-quantitativa, a expressão foi alta em todos os casos. Quando comparados com pele normal, tanto TLR4 quanto TLR2 mostraram menor expressão no epitélio (figura 7 e 8). Na análise semi-quantitativa da expressão de TLR2 no epitélio, a expressão foi alta em quatro casos, moderada em cinco casos e baixa em três casos. A expressão de TLR4 no epitélio foi baixa em todos os casos (Tabela 4). Não houve expressão de TLR9 na epiderme nos casos de leishmaniose cutânea (figura 9).

Figura 7 – Características de expressão de TLR2 no epitélio em todos os casos estudados e na pele normal (N1, N2, N3 e N4) (aumento 400x)

Figura 8 – Características de expressão de TLR4 no epitélio em todos os casos estudados e na pele normal (N1, N2, N3 e N4) (aumento 400x)

Figura 9 – Expressão de TLR9 na epiderme. Acima – pele de pacientes com leishmaniose cutânea (aumento 250x); abaixo - pele normal (aumento 400x)

Tabela 4 – Análise semi-quantitativa de expressão de receptores TLR2, TLR4 e TLR9 na epiderme

Caso	TLR2	TLR4	TLR9
Normal (4 casos)	Alta	Alta	Alta
8	Baixa	Nula	Nula
12	Moderada	Nula	Nula
31	Moderada	Nula	Nula
38	Moderada	Nula	Nula
39	Moderada	Nula	Nula
50	Baixa	Baixa	Nula
66	Baixa	Baixa	Nula
88	Alta	Nula	Nula
94	Alta	Nula	Nula
108	Moderada	Baixa	Nula
401	Moderada	Baixa	Nula
403	Alta	Baixa	Nula

5.1.3.2 *Derme*

A média de células expressando TLR2 foi de $136,26 \pm 82,46$ células/mm², ao passo que a média de células expressando TLR4 foi de $3,21 \pm 4,11$ células/mm². Na figura 10 está demonstrado o padrão de expressão de TLR2 e TLR4 na pele. Na figura 5 e 6 está o gráfico comparando com outras células e citocinas.

Figura 10 – Aspecto microscópico da expressão de TLR2 e TLR4 na derme de pacientes com leishmaniose (lado direito) em relação à pele normal (lado esquerdo) (aumento 1000x)

A contagem de TLR9 foi de $86,15 \pm 88,36$ células/mm² predominando em áreas de formação de granulomas (figura 11). Algumas células esparsas na derme também expressaram TLR9, mas foi nítida a relação com o granuloma. As células gigantes multinucleadas expressaram TLR9, além de alguns macrófagos na periferia destes granulomas.

Figura 11 – Padrão de expressão de TLR9 restrito ao granuloma. Direita: granuloma em aumento 250x; meio: granuloma em aumento 400x e; destaque para a célula gigante multinucleada expressando TLR9

A contagem de TLR2 foi superior a de TLR4 ($p < 0,001$), mas não estatisticamente superior a de TLR9. A expressão de TLR9 não foi estatisticamente superior a de TLR4.

5.1.3.3 Endotélio

A expressão de TLR2 foi visualizada em todas as células nucleadas endoteliais da pele normal (100%). Nos casos de leishmaniose a expressão de TLR2 no endotélio estava diminuída (12,5% do total de células endoteliais nucleadas).

Todas as células endoteliais nucleadas apresentaram expressão de TLR4 na pele normal (100%). Nos casos de leishmaniose não houve expressão de TLR4 pelas células endoteliais (0%) (figura 12). Não houve expressão de TLR9 no endotélio de pele normal e nem nos casos de leishmaniose.

Figura 12 – Aspecto da expressão de TLR2 e TLR4 no endotélio de pele normal e a ausência em pacientes com leishmaniose cutânea (aumento 400x)

5.1.4 Correlação entre TLR, fenótipos celulares e citocinas

A média de células expressando TLR4 e TLR9 foi inferior à media de CD4+, CD8+, macrófagos e células dendríticas ($p < 0,05$). A média de células expressando TLR2 foi superior a de células NK. A expressão de TLR2 foi superior a de TLR4 e TLR9 ($p < 0,05$).

A expressão de TLR4 foi inferior a de todas as outras células expressando citocinas ($p < 0,05$). A expressão de TLR2 foi superior a de IL-10, IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ ($p < 0,05$). A expressão de TLR9 foi inferior apenas a expressão de IL-12 e IL-4 ($p < 0,05$).

No teste de correlação de Spearman não houve correlação entre a quantidade células e citocinas com a expressão dos TLRs. Isto é, não foi encontrada uma força de associação da quantidade de células que expressavam qualquer um dos TLRs com os diferentes fenótipos e citocinas. Quando testamos estas variáveis mediante a regressão linear não foi encontrada relação entre a contagem de células marcadas com TLR2 e a contagem de outras células, reforçando não haver relação entre a quantidade de TLR2 e a quantidade de outras células (figura 13). Da mesma forma não houve relação na quantidade de expressão de TLR4 e TLR9 com os fenótipos celulares avaliados (Figura 14). Não houve relação linear entre a quantidade de células expressando TLR2 e TLR4 com a quantidade de células expressando citocinas (figura 15 e 16). Porém, na análise de regressão logística houve uma associação entre TLR9 e duas citocinas, (IL-12 e IL-4). Essa associação sugeriu que a aumento proporcional da expressão de TLR9 relacionava-se com maior expressão de IL-12 e IL-4 ($p < 0,05$) (figura 17 e 18).

Figura 13 – Regressão linear demonstrando ausência de correlação entre a expressão fenotípica e a quantidade de TLR2 em cada paciente

Figura 14 – Regressão linear demonstrando ausência de correlação entre a expressão fenotípica e a quantidade de TLR4 em cada paciente

Figura 15 – Regressão linear demonstrando ausência de correlação entre a quantidade de citocinas e a quantidade de TLR2 em cada paciente

Figura 16 – Regressão linear demonstrando ausência de correlação entre a quantidade de citocinas e a quantidade de TLR4 em cada paciente

Figura 17 – Regressão linear demonstrando ausência de correlação entre a expressão fenotípica e a quantidade de TLR9 em cada paciente

Figura 18 – Regressão linear demonstrando a correlação entre a expressão de citocinas e a quantidade de TLR9 em cada paciente

5.1.5 Dupla marcação

A dupla marcação com peroxidase e fosfatase demonstrou que os macrófagos expressam TLR2. A dupla marcação não mostrou expressão de TLR2 nas células dendríticas (CD1a+) ou nas células NK (CD57+) (figura 19). Não foram visualizadas células marcadas com TLR4 e com os fenótipos estudados (CD68+, CD57+ e CD1a+). Não foi realizada dupla marcação para TLR9 devido a clara evidência entre este receptor e os macrófagos.

Figura 19 – Dupla marcação demonstrando macrófagos expressando TLR2. A) célula expressando apenas o TLR2; B) células expressando TLR2 e CD68+; C) células expressando apenas CD68+ (aumento 1000x)

6. DISCUSSÃO

A presença de TLRs nas biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea não foi uma surpresa. Os modelos animais de leishmaniose já haviam demonstrado a expressão destes receptores na pele, seja por técnicas moleculares ou de imunoistoquímica (Tuon et al., 2008a). Nestes modelos, a expressão de TLRs foi demonstrada em macrófagos (de Veer et al., 2003; Flandin et al., 2006; Kropf et al., 2004b; Kropf et al., 2004a; Antoniazzi et al., 2004; Hawn et al., 2002; Hawlisch et al., 2005), células dendríticas (De Trez et al., 2004; Muraille et al., 2003), assim como nas células NK (Becker et al., 2003). Por outro lado, a expressão em células endoteliais e em queratinócitos ainda não havia sido descrita na leishmaniose.

6.1 Receptor Toll-like 2

A maioria dos estudos publicados até o momento sobre leishmaniose avaliou o TLR2. Esta tendência provavelmente se deve à confirmação de que o TLR2 é responsável pelo reconhecimento do LPG, o principal componente da parede externa da leishmânia (Becker et al., 2003). A ligação do LPG ao TLR2 desencadeia uma série de reações enzimáticas intracelulares, as quais levam à produção de citocinas da resposta imune inata. Nós demonstramos que o TLR2 estava presente nos macrófagos, a principal célula envolvida na leishmaniose cutânea, indo ao encontro dos modelos laboratoriais descritos anteriormente (de Veer et al., 2003; Flandin et al., 2006; Kropf et al., 2004b; Kropf et al., 2004a; Antoniazzi et al., 2004; Hawn et al., 2002; Hawlisch et al., 2005).

A relação entre os TLRs com síntese de citocinas da resposta imune inata nos motivou a quantificarmos a expressão de ambos e dispomos estes dados contínuos para determinar uma relação linear. Não encontramos relação linear ou correlação entre a expressão de

TLR2 com as citocinas de resposta imune inata (IL-12, IL-1, IL6, TNF- α). Embora seja didático separar a resposta imune como um evento sequencial, iniciado na fase inata e seguido pela fase adaptativa, essas respostas se entrelaçam e estão relacionadas com predomínio de certos padrões fenotípicos celulares e de citocinas, e não apenas determinadas pelo tempo da doença. Diante dessa consideração e devido às biópsias serem realizadas em lesões com mais de 30 dias de evolução, a nossa avaliação de citocinas expandiu-se para aquelas relacionadas com a resposta imune adaptativa, como IL-4, IL-10 e IFN- γ . Também não houve tendência de linearidade ou correlação entre TLR2 e as citocinas da resposta imune adaptativa Th1(IFN- γ) e nem na resposta imune adaptativa Th2 (IL-4 e IL-10). Neste momento, cabe lembrar aqui que a IL-10 também é uma citocina participante da resposta imune regulatória (Th3), a qual não revelou associação linear.

A falta de correlação entre quantidade de citocinas e TLR2 pode ser justificada por diversos fatores. Os TLRs são responsáveis pelo reconhecimento do parasito e desencadeiam a produção de citocinas que, com o passar dos dias, é influenciada por diversas moléculas (quimiocinas e diversas outras citocinas, por exemplo) provenientes de outras células ou até mesmos da própria célula invadida pelo parasito. A IL-12, por exemplo, é produzida imediatamente após o contato com a *Leishmania*, e pode ser inibida com a síntese de IL-10, que também é induzida pelo parasito (Akuffo et al., 1999). Além deste mecanismo de inibição através da IL-10, a *Leishmania* pode inibir diretamente a produção da IL-12 alterando a cascata da ativação do TLR por inibição enzimática (Weinheber et al., 1998). Como se não bastasse, as formas amastigotas (presentes no interior do macrófago) apresentam enzimas com ação proteolítica contra o NF- κ B, impedindo a última reação da cascata de ativação dos TLRs (Cameron et al., 2004). Neste caso, após a fagocitose, a leishmânia promove um aumento na produção destas peptidases

para ter o benefício de redução da resposta imune inflamatória e permitir a multiplicação do parasito (Bryson et al., 2009).

Diversos fatores podem interferir na expressão do TLR2 na superfície das células, como álcool, tabagismo, atividade física e medicamentos (Kox et al., 2009; Chiu et al., 2009). Estes fatores são controláveis em modelos, mas não é possível totalmente no seres humanos. Outro fator interessante que poderia mudar o comportamento da expressão de TLR2 durante a doença é a persistente estimulação do receptor pelo parasito, levando a saturação de sua atividade e até mesmo da expressão pela limitação da transcrição do RNA mensageiro. Esse fato é descrito em outros modelos de ativação de TLR, como na exposição prolongada a toxinas bacterianas, que promovem diminuição da expressão de TLR2 na superfície de células mesenquimais (Mo et al., 2008). Recentemente um trabalho demonstrou que a *Leishmania donovani* (responsável pela forma visceral da leishmaniose), promove diminuição da síntese de IL-12 mediada por *down-regulation* do TLR2 (Bhattacharya et al., 2010). Neste trabalho, a síntese de IL-12 foi recuperada mediante a utilização um antígeno de *Mycobacterium smegmatis*, que ativa o TLR2.

A multiplicação intensa de células e a continua produção de citocinas leva a diminuição da síntese de TLR para a superfície da célula. Esta diminuição de síntese se dá pelo próprio NF- κ B, como já foi descrito para alguns TLRs (Cai et al., 2009; Shi et al., 2009).

A expressão de TLR2 não foi encontrada nas células de Langerhans (CD1a+). Sabemos que o TLR2 está presente nas células dendríticas, sejam da linhagem dérmica ou não. Na pele, além das células de Langerhans, temos os dendrócitos dérmicos tipo I (fator XIIIa+) e tipo II (CD34+). Algumas células de Langerhans foram encontradas na derme, mas estavam presentes quase exclusivamente na epiderme. Os trabalhos experimentais com células dendríticas contemplam apenas as células de origem extra-cutânea, não

permitindo uma análise comparativa com os nossos dados. O papel das células de Langerhans na leishmaniose cutânea já foi questionado, devido ausência de antígenos na epiderme, os quais ficam praticamente restritos a derme, cujo papel de apresentação antigênica ocorre principalmente pelos macrófagos (Axelrod et al., 1994). Porém, estudos mais recentes mostraram que a célula dendrítica é uma das células mais importantes na fase inicial de infecção, por apresentar os antígenos de *Leishmania* aos linfócitos T, dando início a resposta imune adaptativa. Após a fase inicial da infecção, a presença de células de Langerhans é baixa, seja por exaustão das fontes destas células ou pela mudança na forma de apresentação antigênica na doença crônica, dando maior importância ao macrófago para o controle da infecção após a ativação pelo IFN- γ (Meymandi et al., 2004). Por estes motivos, talvez a associação de TLR2 e células de Langerhans não seja importante na fase crônica da doença, como demonstramos pela dupla marcação imunoistoquímica.

Não foram encontradas células NK expressando TLR2. Esta célula expressa o TLR2, porém, a ausência nos nossos casos pode ser justificada pelo pequeno número de células encontradas durante a fase avançada de doença, assim como a sua pouca importância nesta fase de doença. Na resposta imune inata as células NK foram motivos de vários questionamentos, principalmente sobre a real função e necessidade destas células no controle inicial da doença. As células NK com perfil CD4⁺, receptor T V α 14 e receptor para IL-2 β são fundamentais para o controle da infecção até a quinta semana em modelos animais (Ishikawa et al., 2000). Esta célula aumenta a expressão de HSP65 pelo macrófago, reduzindo a taxa de apoptose destas células, contribuindo para controle da infecção (Sakai et al., 1999). Porém, um estudo com modelo animal de *L. major* demonstrou que as células NK não são fundamentais para o controle tardio da infecção (Mattner et al., 2006). O TLR2 nas células NK pode reconhecer o LPG presente na

superfície da *Leishmania*, sendo um aliado na resposta imune inata, mas a sua importância na doença já estabelecida ainda não foi avaliada. Em nossa análise, a relação entre TLR2 e célula NK na doença já estabelecida não parece ter significado expressivo.

6.2 Receptor Toll-like 4

Poucas células na derme dos pacientes com leishmaniose apresentaram expressão de TLR4. Os primeiros estudos em camundongos demonstraram que o TLR4 era importante no controle/cura da leishmaniose cutânea por *L. major* (Hawlish et al., 2005; Kropf et al., 2004a; Kropf et al., 2004b). Um estudo e duas revisões recentes não dão suporte para a importância isolada do TLR4 (Gazzinelli et al., 2006; Tuon et al., 2008a; Antoniazzi et al., 2004). Além disso, até o momento não foram descritos quais antígenos do parasito poderiam se ligar ao TLR4, corroborando para a dúvida do papel desse receptor na leishmaniose cutânea. Tanto o TLR2 quanto o TLR4 reconhecem derivados lipídicos, porém, de estruturas diferentes, isto é, diferentes PAMPs. O melhor exemplo para explicar esta diferença de reconhecimento molecular é a infecção por bactérias Gram negativas e Gram positivas. Nas primeiras ocorre o reconhecimento pelo TLR4 e nas últimas pelo TLR2, embora os antígenos reconhecidos pertençam ao mesmo grupo de biomoléculas (Takeuchi et al., 1999; Yoshimura et al., 1999; Tapping et al., 2000). A cascata de reações desencadeadas pelo TLR4 e TLR2 são as mesmas, uma vez que ambos estão ligados a mesma porção intracelular (MyD88), a qual está ligada a todos os TLRs.

Não podemos confirmar que o TLR4 não seja importante na leishmaniose, apenas concluímos que existe pouca expressão nesta fase da doença. É possível que existam fatores locais ou auto-regulatórios que promovam uma diminuição da expressão após o processo agudo (*down-regulation*). A ativação repetitiva do receptor promove saturação da sua atividade, diminuindo a síntese de RNA mensageiro para produção de novos

receptores, como acontece quando receptores C5 são ativados pelo complemento (Hawlish et al., 2005).

Assim como no TLR2, não encontramos uma relação de expressão de citocinas com a quantidade de TLR4 no tecido. As considerações descritas para o TLR2 valem igualmente para o TLR4. Na correlação de quantidade de macrófagos, mastócitos, linfócitos (CD4 e CD8), células NK e células de Langerhans com as células que expressaram TLR4, não foi encontrada nenhuma relação linear.

Apesar da controvérsia sobre o TLR4 na leishmaniose cutânea, estudo ainda não publicado demonstrou que o polimorfismo deste receptor pode favorecer o aparecimento de leishmaniose cutânea no Irã. As espécies de leishmânia neste país são diferentes das encontradas no Brasil, necessitando maiores estudos sobre polimorfismos em pacientes brasileiros, assim como maiores estudos avaliando TLR4 na infecção por *L. braziliensis*.

6.3 Receptor Toll-like 9

Não existem estudos avaliando a expressão de TLR9 na pele de pacientes com leishmaniose cutânea. TLR9 é importante para a resposta imune inata devido à ativação de células NK e macrófagos mediante a produção de IL-12 (bou Fakher et al., 2009). Portanto, existe uma relação direta de TLR9 com IL-12, como encontramos na regressão linear. A formação do granuloma é o processo inflamatório mais importante na pele dos pacientes com leishmaniose cutânea. Este achado histológico sugere uma resposta imune adaptativa com tendência inflamatória (Th1) que, teoricamente, colabora no controle da multiplicação do parasito, mediante a produção de IFN- γ . Após a fagocitose pelos macrófagos, o parasito é degradado e são liberados fragmentos de seu DNA. Partes destes fragmentos podem ser reconhecidos pelo TLR9, os denominados CpG *motifs* (não existe uma tradução para o português). Os CpG *motifs* são caracterizados por sequências de

citosina e guanina repetidas. Como a leishmânia consegue se multiplicar dentro dos macrófagos é possível que ocorra uma contínua estimulação para a expressão de TLR9. Nosso estudo demonstrou que existe um predomínio da expressão de TLR9 nas áreas de granuloma, onde se concentram os macrófagos.

O TLR9 é importante para a manutenção do granuloma na tuberculose, nos granulomas hepáticos e nas doenças granulomatosas pulmonares crônicas (Ito et al., 2009). Na leishmaniose cutânea, o TLR9 pode ser um fator chave na composição do granuloma e eliminação do parasito. Mais estudos serão necessários para confirmar o nosso achado, utilizando-se de técnicas de transcrição de DNA.

O TLR9 está associado diretamente com o padrão Th1 de resposta imune. Nós encontramos uma relação direta com IL-4, porém, esta citocina é característica de resposta imune Th2. Esta curiosa relação positiva entre TLR9 e IL-4 também foi descrita em estudo de imunoistoquímica de pacientes com dermatopolimiosite, cujos autores também esperavam que houvesse uma relação inversa entre TLR9 e IL-4 (Kim et al., 2010).

A IL-4 atua inibindo o sistema de ativação macrofagocitária e de liberação de radicais livres de oxigênio, inibindo diretamente a ação leishmanicida do macrófago (Ho et al., 1992). Da mesma forma, a IL-4 é capaz de inibir a síntese de TNF- α pelos macrófagos e diminuir a ativação destas células pelo IFN- γ (Heinzel et al., 1989). A IL-4 elevada associa-se com progressão da doença ou dificuldade na cicatrização de lesões cutâneas. Os níveis de IL-4 são contra-balanceados com a atividade de TNF- α , IFN- γ e IL12 (Boom et al., 1990). A produção precoce de IL-4, embora não pareça interferir a expressão de IFN- γ , diminui a síntese de IL-12 e desta forma diminui a intensidade do sinal de expressão de outras citocinas Th1 (Launois et al., 1997a; Launois et al., 1997b). Sinteticamente, IL-12 promove cicatrização mais rápida, ao passo que a IL-4 atrasa esse processo (Gabaglia et al., 1999).

Uma hipótese que explicaria uma relação entre TLR9 e IL-4 seria a da manutenção do parasito e a formação do granuloma. Nas doenças granulomatosas, a persistência do microrganismo leva a uma constante produção de fatores inflamatórios, ativando macrófagos e construindo a arquitetura do granuloma, constituídos de macrófagos e células maduras epitelióides na periferia. Uma hipótese seria que a expressão aumentada de TLR9 promoveria uma maior síntese de IL-12 e que a produção de IL-4 seria originária da indução de uma resposta Th2 para contrabalancear a resposta Th1 mais intensa.

Não encontramos uma relação entre TLR4 e TLR2 com o granuloma, apesar da presença significativa deste último na derme. No granuloma, não existe aumento da expressão de TLR2 e TLR4, e Xia et al. consideram que o TNF- α presente de forma continua nesta região promove uma diminuição da expressão dos TLR2 e TLR4 (Xia et al., 2008).

6.4 Receptores Toll-like e a epiderme

Diferente das condições avaliadas na derme, onde existe um processo inflamatório importante com infiltração celular, o comportamento dos TLR avaliados na epiderme foi diferente. Na pele normal houve expressão alta de TLR2, TLR4 e TLR9. Na epiderme do pacientes com leishmaniose, a expressão foi reduzida para todos os TLRs, principalmente no TLR9.

A expressão de TLR4 nos queratinócitos foi descrita inicialmente por Song et al. (Song et al., 2002). Pivarcsi et al. descreveram a expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 nos queratinócitos que quando induzidos com determinadas PAMPs levavam a síntese de citocinas (Pivarcsi et al., 2003). Com a ajuda dos TLRs, os queratinócitos estão entre as primeiras células sinalizadoras de um processo inflamatório, reconhecendo os patógenos e

iniciando a produção de citocinas pró-inflamatórias, levando à atração de neutrófilos para o sítio de uma possível infecção.

O conhecimento da expressão dos TLRs na fase crônica de processos inflamatórios ainda é incerto. Temos algumas doenças modelos, como a psoríase e o molusco contagioso, que já foram estudadas. Estudo comparando pele normal com a de pacientes com psoríase demonstrou uma diminuição na expressão de TLR9 nos pacientes doentes (Curry et al., 2003). Por outro lado, estudo avaliando apenas o TLR9, demonstrou que havia uma expressão normal de TLR9 em algumas camadas da epiderme na fase de cicatrização, provavelmente relacionada ao TGF- α (Miller et al., 2005). Nós encontramos um padrão semelhante ao descrito por Curry et al. (Curry et al., 2003), o qual sugere que a redução na expressão dos TLRs previne o dano da epiderme, evitando constante ativação celular e produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias. A redução na expressão poderia ser regulada por uma resposta imune Th3, conforme descrito por Miler et al. (Miller et al., 2005). Já na micose fungóide, no líquen plano, na verruga vulgar e no molusco contagioso, por exemplo, a expressão de TLR9 pelos queratinócitos está aumentada (Li et al., 2007; Jarrousse et al., 2006; Ku et al., 2008).

A explicação para esta diferença de expressão ainda não está esclarecida. Nós especulamos que uma espécie de *down-regulation* pode ocorrer após o início da resposta imune inata, quando a resposta imune adaptativa se sobrepõe, principalmente às custas do sistema Th3, responsável pela imuno-regulação. A manutenção da expressão de TLR9 no granuloma e a diminuição na epiderme funcionaria como um mecanismo de contenção do parasito no local da inflamação e ao mesmo tempo uma diminuição na epiderme para evitar uma inflamação mais intensa num local que não é necessário, além de evitar uma dermatite disseminada.

Na psoríase, embora ocorra diminuição da expressão de TLR9, outro estudo demonstrou que o TLR2 estava aumentando em relação com a pele normal, o que não ocorreu com o TLR4 (Begon et al., 2007).

6.5 Receptor Toll-like e endotélio

O endotélio vascular apresenta propriedades anti-coagulantes e anti-adesivas em sua superfície, prevenindo a formação de coágulos e a migração de neutrófilos e monócitos para os tecidos. Em circunstâncias inflamatórias, o endotélio se torna ativado, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. O padrão de expressão dos TLRs no endotélio humano ainda não está bem definido, mas se sabe que é diferente do camundongo, e varia conforme a localização do vaso (Erridge et al., 2007). As células endoteliais classicamente expressam TLR4. Este conhecimento é baseado nos estudos que avaliam a identificação do LPS de bacilos Gram-negativos e desencadeamento da sepse (Andonegui et al., 2003; Dunzendorfer et al., 2004; Hijiya et al., 2002; Zeuke et al., 2002). A expressão de TLR2 não é tão significativa quanto a de TLR4, mas é tão importante quanto, pois é ativado por antígenos de cocos Gram-positivos, da mesma forma como acontece com o TLR4 (Satta et al., 2008). O TLR9 também desempenha papel no endotélio, mas ele é responsável pelo reconhecimento das frações CpG presente no DNA bacteriano (El et al., 2009; Martin-Armas et al., 2006). Não existem descrições na literatura sobre TLRs, endotélio e doenças parasitárias. Nós encontramos expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 no endotélio da pele normal, o que condiz com a literatura, mas houve uma diminuição nas células endoteliais dos pacientes com leishmaniose. A ativação destes receptores promove a atração de neutrófilos devido à síntese de quimiocinas, como a IL-8 (El et al., 2009). Na leishmaniose, a diminuição da expressão pode ser um

mecanismo protetor do organismo para evitar intensa ativação celular endotelial e evitar a cascata de coagulação, como ocorre na sepse. Outra possibilidade seria um mecanismo induzido pelo próprio parasito para inibir a quantidade de células que atingissem o foco da infecção. Isto é, seria mais um dos mecanismos de escape que a leishmânia utilizaria para sobreviver no hospedeiro.

6.6 Considerações finais

A leishmaniose cutânea causada pela *L. braziliensis* apresentou uma relação direta com TLR2, expresso pelos macrófagos. A expressão de TLR4 e TLR9 foi significativamente menor que a de TLR2. Independente do TLR, houve diminuição da expressão na epiderme e no endotélio em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, o que pode ser uma forma de *down-regulation* para evitar processo inflamatório afora do granuloma, evitando dermatite importante e possibilidade de expansão da lesão ulcerosa às custas da ativação dos queratinócitos. Ao mesmo tempo, a diminuição da expressão em células endoteliais pode ser um mecanismo de segurança para evitar o aporte excessivo de células inflamatórias para as áreas de granuloma já na doença estabelecida. O TLR9 correlacionou-se com as áreas de granuloma onde existe destruição do parasito e exposição de seu DNA, o qual é reconhecido por este receptor. Já o TLR4 não teve expressão significativa em nenhuma parte da pele, o que corrobora por estudos prévios (Antoniazi et al., 2004). O conhecimento do padrão de expressão ajudará no futuro desenvolvimento de drogas específicas e criação de vacinas. Devido à descoberta da relação entre sepse e os TLRs, existe intensa investigação em drogas que atuem neste mecanismo para evitar a progressão da sepse, assim como compreender a predisposição

das pessoas a formas graves da doença. Com o conhecimento do comportamento destes receptores na leishmaniose, drogas cujo objetivo seja de tratamento da sepse, poderão ser testadas em pacientes esta parasitose, uma vez que é sabida a falta de investimento em pesquisa de doenças parasitárias.

7. CONCLUSÕES

A investigação dos receptores toll-like (2, 4 e 9) no processo de infecção pela leishmânia nos permitiu concluir que:

- 1 A expressão do TLR2 na derme é estatisticamente maior que a de TLR4 e TLR9, relacionando este receptor com o reconhecimento da leishmânia.
- 2 A expressão do TLR2 na derme ocorre principalmente pelos macrófagos conforme demonstrado pela dupla marcação imunoistoquímica, expressando a relação significativa desta célula com o parasito já bem estabelecida na fase crônica da leishmaniose cutânea.
- 3 Não foi identificado expressão de TLR2, TLR4 ou TLR9 nas células de Langerhans. Isto se daria por uma deficiência individual dos mesmos nos pacientes com leishmaniose cutânea o que resultaria em não ativação e diminuição de células de Langerhans na epiderme.
- 4 A expressão de TLR9 ocorre principalmente nas áreas de granulomas, o que não aconteceu com TLR2 e TLR4. O envolvimento deste receptor com o granuloma aponta o seu papel nas relações parasito-hospedeiro uma vez que este padrão celular é uma importante característica patológica da leishmaniose.
- 5 A quantidade de TLR9 relacionou-se diretamente com a expressão de IL-12 e IL-4. A relação com IL-12 sugere que existe uma manutenção de resposta imune inflamatória inata mesmo durante a fase crônica da doença. A relação de IL-4 pode ser o equilíbrio necessário que o organismo lança mão para o controle da resposta Th1 excessiva, para evitar o dano tecidual.

- 6 A leishmaniose promove uma diminuição da expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 na epiderme, possivelmente relacionada com diminuição da atividade destes receptores nos queratinócitos.
- 7 A infecção pela leishmânia promoveu mudança no padrão de expressão de TLR2 e TLR4 pelas células endoteliais vasculares na derme, diminuindo a sua expressão em relação à pele normal. Este seria um mecanismo adicional das leishmânias para impedir sua destruição ou um mecanismo de proteção do hospedeiro para evitar a migração de células inflamatórias visando diminuir o dano tecidual.

8. ANEXOS

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 16.10.07, **APROVOU**, *ad-referendum*, o Protocolo de Pesquisa nº **0913/07**, intitulado "**DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TOLL-LIKE, DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E FENÓTIPO CELULAR NA LESÃO CUTÂNEA DE PACIENTES COM A FORMA CUTÂNEA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**", apresentado pelo Departamento de **DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Valdir Sabbaga Amato**

Pesquisador (a) Executante: **Dr. Felipe Francisco Tuon**

CAPPesq, 16 de outubro de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ANTICORPOS UTILIZADOS PARA IMUNOHISTOQUÍMICA

Anticorpo	Diluição	Marca	Código	Origem
Anti-CD68 humano	1:50	DAKO	M876	camundongo
Anti-CD57 humano	1:1000	Labvision	MS136P	camundongo
Anti-CD1a humano	sem	Serotec	MCA1657	camundongo
Anti-CD4 humano	1:1000	DAKO	M834	camundongo
Anti-CD8 humano	1:1000	DAKO	M7103	camundongo
Anti-TNF humano	1:300	R&D	AF20NA	cabra
Anti-IFN humano	1:200	R&D	MAB285	camundongo
Anti-IL1 humano	1:40	R&D	AF215NA	cabra
Anti-IL4 humano	1:20	R&D	AB204NA	cabra
Anti-IL6 humano	1:40	R&D	AF206NA	cabra
Anti-IL12 humano	1:40	R&D	AB211NA	cabra
Anti-IL10 humano	1:40	R&D	MAB217	camundongo
		<i>* in</i>		
Anti-Leishmania	1:800	<i>house</i>		coelho

Anticorpo	Diluição	Marca	Código	Origem
Anti-CD68	1:50	DAKO	M876	camundongo
Anti-CD57	1:1000	Labvision	MS136P	camundongo
Anti-CD1a	sem	Serotec	MCA1657	camundongo
Anti-CD4	1:1000	DAKO	M834	camundongo
Anti-CD8	1:1000	DAKO	M7103	camundongo
Anti-TNF	1:300	R&D	AF20NA	cabra
Anti-IFN	1:200	R&D	MAB285	camundongo
Anti-IL1	1:40	R&D	AF215NA	cabra
Anti-IL4	1:20	R&D	AB204NA	cabra
Anti-IL6	1:40	R&D	AF206NA	cabra
Anti-IL12	1:40	R&D	AB211NA	cabra
Anti-IL10	1:40	R&D	MAB217	camundongo
		<i>* in</i>		
Anti-Leishmania	1:800	<i>house</i>		coelho

CONTAGEM CELULAR – FENÓTIPOS CELULARES

Casos	CD4	CD8	CD68	CD57	Mastócitos	CD1
8	738	225	576	6,41025641	13,33333333	22,2
12	1000	60,25641	616,66667	1,068376068	8	0,2
31	776,92308	412,82051	446,15385	7,692307692	21,33	31,8
38	496,15385	271,79487	716,66667	28,20512821	34,67	0,416666667
39	760,25641	484,61538	779,48718	8,974358974	25,33	17,2
50	1137,1795	498,71795	980,76923	10,25641026	30,66666667	28,8
66	206,41026	469,23077	279,48718	3,846153846	6,666666667	20,7
88	523,07692	182,05128	770,51282	2,564102564	5,33	21,125
94	24,358974	0	458,97436	8,974358974	10,66666667	14,3
108	1007,6923	12,820513	629,48718	28,20512821	2,666666667	52,8
401	1289,7436	23,076923	647,4359	23,07692308	15,8	48,66666667
403	902,5641	60,25641	216,96252	14,1025641	15,8	30,4
Média	738,52991	225,05342	593,21696	11,9480057	15,855	24,05069444
Mediana	768,58974	203,52564	623,07692	8,974358974	14,56666667	21,6625
Variança	139162,2	39270,924	46937,36	90,77011347	105,2053505	258,9120765
Desvio Padrão	373,0445	198,16893	216,65032	9,527335067	10,25696595	16,09074506

CONTAGEM CELULAR – CITOCINAS

	IL-12	TNF	IL1	IL6	IFN	IL4	IL10
8	237,17949	7,6923077	25,641026	10,25641026	6,993006993	256,4102564	79,487179
12	150,76923	0	0	12,82051282	15,38461538	57,69230769	6,4102564
31	142,30769	1,2820513	0	9,615384615	7,692307692	100	0
38	109,89011	5,1282051	7,6923077	20,51282051	6,41025641	83,33333333	3,2051282
39	120,51282	3,8461538	10,25641	6,41025641	2,564102564	50	1,2820513
50	115,38462	8,7912088	25,641026	0	25,64102564	0	1,2820513
66	0	0	19,230769	14,1025641	19,23076923	62,82051282	0,6410256
88	30,769231	26,923077	1,2820513	6,41025641	3,846153846	62,82051282	1,2820513
94	40	26,923077	3,8461538	52,56410256	2,564102564	157,6923077	7,6923077
108	89,74359	5,1282051	0	2,564102564	64,1025641	167,9487179	23,076923
401	94,871795	1,2820513	6,4102564	17,94871795	38,46153846	67,94871795	19,230769
403	101,28205	19,230769	1,2820513	6,41025641	19,23076923	78,20512821	128,20513
Média	102,72589	8,8522589	8,4401709	13,30128205	17,67676768	95,40598291	22,649573
Mediana	105,58608	5,1282051	5,1282051	9,935897436	11,53846154	73,07692308	4,8076923
Variança	3852,5285	98,755538	95,767836	188,506739	331,7920101	4635,544299	1601,543
Desvio Padrão	62,06874	9,9375821	9,7861042	13,72977564	18,2151588	68,08483164	40,019283

CONTAGEM CELULAR – RECEPTORES TOLL-LIKE2, 4 E 9

Casos	TLR2	TLR4	TLR9	TLR2 endotelio	TLR4 endotélío	TLR9 endotélío
8	36	2,6666667	298,46154	2,666666667	0	0
12	90,666667	0	164,61538	4	0	0
31	165,33333	2,2857143	0	2,666666667	0	0
38	50,909091	0	92,307692	1,454545455	0	0
39	128	0	132,30769	0	0	0
50	116	13,538462	0	2,666666667	0	0
66	132,8	0	0	24	0	0
88	281,33333	1,2307692	72,307692	1,333333333	0	0
94	154,18182	3,4285714	130,76923	0	0	0
108	88	7,3846154	61,538462	9,142857143	0	0
401	89,142857	1,3333333	81,538462	29,71428571	0	0
403	304	6,6666667	0	40	0	0
Média	136,36392	3,2112332	86,153846	9,803751804	0	0
Mediana	122	1,8095238	76,923077	2,666666667	0	0
Variança	6800,4197	16,900543	7808,9295	184,5813484	0	0
Desvio Padrão	82,464658	4,1110271	88,368148	13,58607185	0	0

PUBLICAÇÕES DA TESE (1)

INFECTION AND IMMUNITY, Mar. 2008, p. 866–872
 0019-9567/08/\$08.00+0 doi:10.1128/IAI.01090-07
 Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 76, No. 3

MINIREVIEWS

Toll-Like Receptors and Leishmaniasis[▼]

Felipe F. Tuon,¹ Valdir S. Amato,^{2*} Hélio A. Bacha,¹ Tariq AlMusawi,³
 Maria I. Duarte,⁴ and Vicente Amato Neto⁵

Department of Infectious Diseases, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil¹; Infectious and Parasitic Diseases Clinic, Hospital das Clínicas, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil²; Department of Internal Medicine, Mount Sinai Medical Center, Miami Beach, Florida³; Laboratory of the Discipline of Pathology of Transmissible Diseases, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil⁴; and Laboratory of Medical Investigation—Parasitology (LIM 46), Hospital das Clínicas, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil⁵

More than 10 million people around the world are currently affected by *Leishmania* sp. (33). Infection with this protozoan parasite continues to be a problem in underdeveloped countries and is a continuous worry in developed countries due to the possibility of the disease afflicting tourists returning from countries where the organism is endemic (82). Leishmaniasis is a neglected infectious disease, and it affects poor and marginalized populations. It is distributed, in its visceral, mucosal, and cutaneous forms, throughout more than 90 countries in Africa, the Americas, Asia, and Europe (5). It constitutes a serious public health problem and causes significant morbidity and mortality. In recent years, economic globalization and the increase in travel have extended the distribution of the disease to developed countries. Approximately 350 million people live in areas where there is active parasite transmission of zoonotic and anthroponotic leishmaniasis. Zoonotic transmission occurs in rural and periurban environments, whereas anthroponotic transmission occurs in urban environments (7).

From a strictly biological point of view, de Almeida et al. described humans as just one of the actors in the leishmaniasis drama (23). Also involved are the parasite, the insect, and other hosts.

Several immunological studies have increased our understanding of the adaptive response in leishmaniasis. Thus, this disease has been used as a model of Th1 and Th2 responses. Unfortunately, there are still several aspects of the initial steps of *Leishmania* infection in humans that are largely unknown.

BEFORE INFECTION

Leishmania is a genus of protozoan flagellates belonging to the family Trypanosomatidae and order Kinetoplastida (35). Two distinct developmental stages of *Leishmania* are recognized, the promastigote and the amastigote. Promastigotes are found within the sandfly and may be further classified as procyclic promastigotes, which multiply in the gut of the sandfly,

or as infective metacyclic promastigotes, which are found in parts of the mouth and the anterior gut. The amastigotes live inside lysosomal vacuoles present in phagocytes of the vertebrate host, which are ingested by the female phlebotomine sandfly when it takes an infected blood meal (68). At this time, members of the subfamily Phlebotominae are the main vectors of *Leishmania* sp.; the New World species belong to the genus *Lutzomyia* (84).

An infected sandfly bites a new host during a blood meal and then regurgitates more than 100 metacyclic promastigotes (89). During this phase of the infection, an instantaneous and non-specific immune response is initiated against *Leishmania* factors, saliva products, and the sucking organ of the insect, which is called the “proboscis” (19).

POTENTIAL ANTIGENS

The *Leishmania* surface is covered with molecules that vary depending on the development stage of the parasite (31). The procyclic promastigotes are covered with a 7-nm-thick glycocalyx, and the infective metacyclic promastigotes are covered with a glycocalyx layer that is at least 17 nm thick. This covering is almost completely absent from the amastigotes, suggesting that the promastigote cell coat is a stage-specific structure that may be lost after phagocytosis and after intracellular transformation (69). The glycocalyx consists of glycoproteins and related products. The latter components are composed of members of a family of glycoinositol phospholipids (GIPLs) and lipophosphoglycans (LPG) (49, 50). The whole structure is species specific and constitutes the first antigens to come into contact with the host's immune system (51, 52, 80).

LPG is the main promastigote molecule and is composed of repetitive units of disaccharide and phosphate, which are linked to the external surface of the plasma membrane by the GPI anchor. The structure of LPG is different in different species of *Leishmania* and also in different promastigotes of the same species; LPG is significantly more common in the metacyclic form and is rare in the amastigotes. These differences in the LPG may explain the increasing resistance of metacyclic promastigotes to complement-mediated lysis (51). Recently, Spath et al. demonstrated that *Leishmania* phosphoglycan^{−/−} cells were unable to survive in activated macrophages but retained the ability to persist indefinitely in the

* Corresponding author. Mailing address: Infectious and Parasitic Diseases Clinic, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255, 4º andar, Sala 4028-ICHC, Cerqueira César, 05403-010, São Paulo, Brazil. Phone: 55 11 30696530. Fax: 55 11 30697508. E-mail: valdirsa@netpoint.com.br.

▼ Published ahead of print on 10 December 2007.

PUBLICAÇÕES DA TESE (2)

Letter to the Editor

The expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in the epidermis of patients with cutaneous leishmaniasis

The toll-like receptor (TLR) signaling pathway is one of the first defensive systems against *Leishmania* [1]. After recognition of specific antigens, TLRs trigger NF- κ B, which then proceeds to the nucleus and promotes the transcription and further synthesis of pro-inflammatory cytokines. Keratinocytes not only play an important role in maintaining the physical barrier against external agents, but also participate in cutaneous immune responses [2]. These cells can express TLRs against different pathogenic microorganisms, including virus and bacteria. Experimental studies revealed that TLR2, TLR4 and TLR9 contribute to the recognition of *Leishmania major* and to the subsequent immune response [1]. Nevertheless, the expression of TLRs in the human epidermis during cutaneous leishmaniasis (CL) is unknown.

We present the first study describing the pattern of expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in the epidermis of patients with American CL.

One hundred patients from the Amazon region (Santarem City) with confirmed diagnosis of CL were included in this prospective study after informed consent. Clinical diagnosis of CL was determined as previously described [3]. We included only patients with all the following findings: (1) amastigotes present on cutaneous scraping; (2) positive Montenegro's skin test; (3) immunohistochemistry showing *Leishmania* antigens; (4) *Leishmania braziliensis* confirmed by polymerase chain reaction using a sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from fresh material [3]. A control group with four samples of normal skin biopsy was included.

Toll like receptor expression was determined by immunohistochemistry from cutaneous sections prepared from paraffin-embedded biopsies using anti-TLR2 (AMS Biotechnology, Abington, UK, cód. AP1502), the anti-TLR4 (SANTA CRUZ, Santa Cruz, USA, cód. SC16240) or the anti-TLR9 (ACRIS, Herfordt, Germany, cód. 26C593). The method of deparaffinization, antibody incubation and detection was previously described [3]. One slide was incubated without primary antibody and constituted a negative control. The specific antigen-antibody reaction was detected with a streptavidin-biotin-peroxidase-based system (LSAB® + system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Cellular phenotype of dendritic cells (CD1a+) was determined as described above, using anti-CD1a (SEROTEC, Oxford, UK, cód. MCA1657). Double

immunostaining reaction was used to determine the expression of TLRs by Langerhans cells (CD1a+).

A semi-quantitative analysis was used to compare the expression of TLRs between CL and normal skin. The cases were compared one by one and classified as high, moderate and low.

A total of 12 patients fulfilled the inclusion criteria. All patients were male with a median age of 22 [16–46] years. The median duration of disease before biopsy was 90 [30–120] days. All lesions were localized in the lower limbs. All cases were identified as *L. (V.) braziliensis*.

The expression of TLR2, TLR4 and TLR9 was weaker than normal skin and described in the Table 1. The pattern of expression is pictured in the Fig. 1. Langerhans cells were identified in the epidermis of all cases and control. However, toll-like receptors 2, 4, or 9 were not expressed by Langerhans cells using the double immunostaining study.

The expression of the TLRs (2, 4 and 9) in the epidermis is decreased in patients with CL and Langerhans cells do not express these receptors. Considering this fact, we suggest that only keratinocytes express these TLRs.

Bacterial components from *S. aureus*, Enterobacteriaceae and virus activate TLR2, TLR4 and TLR9, respectively, in the keratinocytes [4]. The activation of TLRs by keratinocytes results in production of several cytokines (e.g. TNF- α , IL-8, IL-12) as well as production of chemokines (e.g. CXCL9 and CXCL10) in experimental model. However, the *in vitro* cannot be extrapolated to *in vivo*, which was used in our study.

We do not have scientific support to explain the expression of TLRs determined in our study. We supposed that there are mechanisms of down-regulation of these receptors in the epidermis during the disease as occurs in HIV infection and some bacterial infections [5]. We found that the expression of TLR2 and TLR9 is increased in inflammatory cells in the dermis, mainly in macrophages (data not shown). The intense expression of TLRs by macrophages during granuloma formation and intense cytokine production could decrease the expression of keratinocytes in this phase of the CL (days after antigen recognition). We cannot discharge the possibility of a high expression during the early phase of the disease, when keratinocytes could play an important role. Unfortunately, our patients were evaluated with more than 30 days of disease.

The expression of TLRs by dendritic cell is well established in the leishmaniasis [6]. However, a previous assay in our laboratory showed that this cell is not associated with TLR expression *in vivo*. In the chronic stage of the ulcer, the expression of TLRs is maintained by macrophages in different stages of maturation but not by Langerhans cells.

This is the first study of TLRs expression by keratinocytes in CL and there are no previous publications to expand our discussion

^o Note: The authors are not part of any associations or commercial relationships that might represent conflicts of interest in the writing of this study (e.g., pharmaceutical stock ownership, consultancy, advisory board membership, relevant patents, or research funding). This study was totally supported by FAPESP (Fundo de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo).

PUBLICAÇÕES DA TESE (3)

Parasite Immunology, 2010, 32, 1–4

DOI: 10.1111/j.1365-3024.2010.01243.x

Brief Definitive Report

The expression of TLR9 in human cutaneous leishmaniasis is associated with granuloma

F. F. TUON,¹ E. R. FERNANDES,² C. PAGLIARI,² M. I. S. DUARTE² & V. S. AMATO³¹Department of Infectious Diseases, University of São Paulo, Medical School, São Paulo, Brazil, ²Laboratory of the Discipline of Pathology of Transmissible Disease, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Infectious and Parasitic Diseases Clinic, Hospital das Clínicas, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

SUMMARY

The Toll-like receptor (TLR) signalling pathway is the first system that defends against *Leishmania*. After recognising *Leishmania* as nonself, TLRs trigger NF- κ B expression. NF- κ B proceeds to the nucleus and promotes the transcription of pro-inflammatory cytokines. TLR9 is thus an important factor in the induction of an effective immune response against *Leishmania*. We examined the pattern of TLR9 expression in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. Prospective study evaluating 12 biopsies from male patients with confirmed cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis* detected by polymerase chain reaction. Normal skin was analysed as a negative control. TLR9 expression was examined by immunohistochemical analysis of paraffin-embedded biopsy tissue. TLR9 expression was evaluated in the epidermis and dermis. TLR9 expression was primarily observed in the granuloma. The protein was detected in a few cells in the dermis. A lower expression level was detected in the epidermis of patients with leishmaniasis when compared with normal skin. The presence of TLR9 in the skin of patients with cutaneous leishmaniasis is associated with granuloma and expressed by macrophages.

Keywords American tegumentary leishmaniasis, leishmaniasis, *Leishmania*, Toll-like receptors

Several immunological studies have increased our understanding of the adaptive response in leishmaniasis. Unfortunately, several aspects of the initial stages of *Leishmania* infection in humans remain largely unknown. The innate immune response has been the target of research in developing a vaccine against this neglected disease (1).

The Toll-like receptor (TLR) signalling pathway is one of the first systems to defend against *Leishmania* (2). After recognising specific antigens, TLRs trigger NF- κ B expression. NF- κ B translocates to the nucleus and promotes the transcription and further synthesis of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6) (3).

Recent studies have revealed that TLR2 and TLR4 contribute to the recognition of *L. major* and to the subsequent immune response against the microorganism (4). However, few studies have evaluated the contribution of TLR9. TLR2 and TLR4 recognise lipid antigens, whereas TLR9 recognises DNA fragments (CpG motifs). Recently, Schleicher *et al.* (5) demonstrated that NK cells were activated following TLR9 activation. Another study demonstrated the increased expression of TLR9 after exposure of macrophages to *Leishmania* DNA (6).

These previous studies were performed under ideal conditions using animal models or cell cultures. TLR9 has not been evaluated in human cutaneous leishmaniasis. Furthermore, all studies using models of leishmaniasis investigated *L. major* and not *L. braziliensis*, the main species of leishmaniasis in the American continent.

The aim of this study was to describe the pattern of expression of TLR9 in human American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*.

This prospective study evaluated 100 Brazilian patients with cutaneous leishmaniasis from the Amazon region

Correspondence: Felipe Tuon, Infectious and Parasitic Diseases Clinic, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255, 4º andar, Sala 4028 – ICHC, Cerqueira César, ZIP code 05403-010, São Paulo, Brazil (e-mail: flptuon@gmail.com).

Disclosures: The authors are not part of any associations or commercial relationships that might represent conflicts of interest in the writing of this study (e.g., pharmaceutical stock ownership, consultancy, advisory board membership, relevant patents, or research funding).

Received: 14 February 2010

Accepted for publication: 22 June 2010

9. REFERÊNCIAS

- Abramson MA, Dietze R, Frucht DM, Schwantz R, Kenney RT. Comparison of New and Old World leishmanins in an endemic region of Brazil. *Clin. Infect. Dis.* 1995;20:1292-7.
- Adachi K, Tsutsui H, Kashiwamura S, Seki E, Nakano H, Takeuchi O, Takeda K, Okumura K, Van KL, Okamura H, Akira S, Nakanishi K. Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2001;167:5928-34.
- Ahmed AA, Ahmed M, Theodorsson E, Nordlind K. Neuropeptide Y concentrations in experimental Leishmania major cutaneous leishmaniasis. *Neuroreport* 1998a;3271-7.
- Ahmed AA, Mutt V, Nordlind K. Modulating effects of sensory and autonomic neuropeptides on murine splenocyte proliferation and cytokine secretion induced by Leishmania major. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1999;21:507-26.
- Ahmed AA, Wahbi A, Nordlind K, Kharazmi A, Sundqvist KG, Mutt V, Liden S. In vitro Leishmania major promastigote-induced macrophage migration is modulated by sensory and autonomic neuropeptides. *Scand. J. Immunol.* 1998b;48:79-85.
- Ahmed AA, Wahbi AH, Nordlin K. Neuropeptides modulate a murine monocyte/macrophage cell line capacity for phagocytosis and killing of Leishmania major parasites. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2001;23:397-409.
- Ahuja SS, Reddick RL, Sato N, Montalbo E, Kostecky V, Zhao W, Dolan MJ, Melby PC, Ahuja SK. Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J. Immunol* 1999;163:3890-7.
- Akuffo H, Alexis A, Eidsmo L, Saed A, Nylen S, Maasho K. Natural killer cells in cross-regulation of IL-12 by IL-10 in Leishmania antigen-stimulated blood donor cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1999;117:529-34.
- Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 2000;12:13-9.
- Andonegui G, Bonder CS, Green F, Mullaly SC, Zbytnuik L, Raharjo E, Kubes P. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* 2003;111:1011-20.
- Antoniazzi S, Price HP, Kropf P, Freudenberg MA, Galanos C, Smith DF, Muller I. Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with Leishmania major. *Infect. Immun.* 2004;72:5168-74.
- Axelrod O, Klaus S, Frankenburg S. Antigen presentation by epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1994;16:593-8.

- Bacellar O, D'Oliveira Jr A, Jeronimo SM, Carvalho EM. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 2000;12:1228-31.
- Banuls AL, Jonquieres R, Guerrini F, Le PF, Barrera C, Espinel I, Guderian R, Echeverria R, Tibayrenc M. Genetic analysis of leishmania parasites in Ecuador: are Leishmania (Viannia) panamensis and Leishmania (V.) Guyanensis distinct taxa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999;61:838-45.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi JG, Momen H, Mahon-Pratt D, Ribeiro de JA, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, . Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that Leishmania amazonensis produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991;44:536-46.
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, Gonzalez A, Maldonado C, Isibasi A. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003;130:65-74.
- Begon E, Michel L, Flageul B, Beaudoin I, Jean-Louis F, Bachelez H, Dubertret L, Musette P. Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur. J Dermatol.* 2007;17:497-506.
- Bertho AL, Santiago MA, Da-Cruz AM, Coutinho SG. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med Biol. Res* 2000;33:317-25.
- Bhattacharya P, Bhattacharjee S, Gupta G, Majumder S, Adhikari A, Mukherjee A, Majumdar SB, Saha B, Majumdar S. Arabinosylated lipoarabinomannan-mediated protection in visceral leishmaniasis through up-regulation of toll-like receptor 2 signaling: an immunoprophylactic approach. *J Infect. Dis.* 2010;202:145-55.
- Blackwell JM, Ezekowitz RA, Roberts MB, Channon JY, Sim RB, Gordon S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind Leishmania in the absence of serum. *J. Exp. Med.* 1985;162:324-31.
- Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1997;17:3-9.
- Blank C, Fuchs H, Rappersberger K, Rollinghoff M, Moll H. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with Leishmania major. *J. Infect. Dis.* 1993;167:418-25.
- Boom WH, Liebster L, Abbas AK, Titus RG. Patterns of cytokine secretion in murine leishmaniasis: correlation with disease progression or resolution
1. *Infect. Immun.* 1990;58:3863-70.
- bou Fakher FH, Rachinel N, Klimczak M, Louis J, Doyen N. TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from Leishmania major favors Th1 cell development and the resolution of lesions. *J. Immunol.* 2009;182:1386-96.

- Bryson K, Besteiro S, McGachy HA, Coombs GH, Mottram JC, Alexander J. Overexpression of the natural inhibitor of cysteine peptidases in *Leishmania mexicana* leads to reduced virulence and a Th1 response. *Infect. Immun.* 2009;77:2971-8.
- Cai Z, Shi Z, Sanchez A, Zhang T, Liu M, Yang J, Wang F, Zhang D. Transcriptional regulation of Tlr11 gene expression in epithelial cells. *J Biol. Chem.* 2009;284:33088-96.
- Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, Alexander J, Plevin R. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol.* 2004;173:3297-304.
- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 2001;167:416-23.
- Caparros E, Serrano D, Puig-Kroger A, Riol L, Lasala F, Martinez I, Vidal-Vanaclocha F, Delgado R, Rodriguez-Fernandez JL, Rivas L, Corbi AL, Colmenares M. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology* 2005;210:185-93.
- Chaudhuri G, Chaudhuri M, Pan A, Chang KP. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J. Biol. Chem.* 1989;264:7483-9.
- Chiu WT, Lin YL, Chou CW, Chen RM. Propofol inhibits lipoteichoic acid-induced iNOS gene expression in macrophages possibly through downregulation of toll-like receptor 2-mediated activation of Raf-MEK1/2-ERK1/2-IKK-NFkappaB. *Chem. Biol. Interact.* 2009;181:430-9.
- Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT, Caceres E, Duque S, Pelaez D, Rodriguez G, Nichols S, . Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 1990;42:206-14.
- Costa RP, Gollob KJ, Machado PR, Bacellar OA, Almeida RP, Barral A, Barral-Netto M, Carvalho EM, Dutra WO. Adhesion molecule expression patterns indicate activation and recruitment of CD4+ T cells from the lymph node to the peripheral blood of early cutaneous leishmaniasis patients. *Immunol Lett.* 2003;90:155-9.
- Cuba-Cuba CA, Evans D, Rosa AC, Marsden PD. Clonal variation within a mucosal isolate derived from a patient with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 1991;33:343-50.
- Curry JL, Qin JZ, Bonish B, Carrick R, Bacon P, Panella J, Robinson J, Nickoloff BJ. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch Pathol. Lab Med.* 2003;127:178-86.

- Das G, Vohra H, Rao A, Saha B, Mishra GC. Leishmania donovani infection of a susceptible host results in CD4⁺ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. *Scand. J. Immunol* 1999;49:307-10.
- De Trez C, Brait M, Leo O, Aebischer T, Torrentera FA, Carlier Y, Muraille E. Myd88-dependent in vivo maturation of splenic dendritic cells induced by Leishmania donovani and other Leishmania species. *Infect. Immun.* 2004;72:824-32.
- de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. MyD88 is essential for clearance of Leishmania major: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* 2003;33:2822-31.
- Debus A, Glasner J, Rollinghoff M, Gessner A. High levels of susceptibility and T helper 2 response in MyD88-deficient mice infected with Leishmania major are interleukin-4 dependent. *Infect. Immun.* 2003;71:7215-8.
- Dominguez M, Moreno I, Lopez-Trascasa M, Torano A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J. Exp. Med.* 2002;195:451-9.
- Duarte MI, Tuon FF, Pagliari C, Kauffman MR, Brasil RA. Human visceral leishmaniasis expresses Th1 pattern in situ liver lesions. *J. Infect.* 2008;57:332-7.
- Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *FASEB J* 2004;18:1117-9.
- El KD, Jozsef L, Pan W, Wang L, Filep JG. Bacterial DNA activates endothelial cells and promotes neutrophil adherence through TLR9 signaling. *J Immunol.* 2009;182:4386-94.
- Erridge C, Spickett CM, Webb DJ. Non-enterobacterial endotoxins stimulate human coronary artery but not venous endothelial cell activation via Toll-like receptor 2. *Cardiovasc. Res.* 2007;73:181-9.
- Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of Leishmania donovani promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur. J. Immunol.* 2006;36:411-20.
- Floch H. Leishmania tropica guyanensis n. ssp., cause of cutaneous leishmaniasis in the Guianas and Central America. *Publ. Inst. Pasteur Guyane. Fr. Inini.* 1954;15:1-4.
- Flynn B, Wang V, Sacks DL, Seder RA, Verthelyi D. Prevention and treatment of cutaneous leishmaniasis in primates by using synthetic type D/A oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs. *Infect. Immun.* 2005;73:4948-54.
- Gabaglia CR, Pedersen B, Hitt M, Burdin N, Sercarz EE, Graham FL, Gauldie J, Braciak TA. A single intramuscular injection with an adenovirus-expressing IL-12 protects BALB/c mice against Leishmania major infection, while treatment with an IL-4-expressing vector increases disease susceptibility in B10.D2 mice. *J. Immunol.* 1999;162:753-60.
- Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991;351:355-6.

- Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6:895-906.
- Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol. Rev.* 2004;201:9-25.
- Gollob KJ, Antonelli LR, Dutra WO. Insights into CD4⁺ memory T cells following Leishmania infection. *Trends Parasitol.* 2005;21:347-50.
- Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002;111:927-30.
- Guy RA, Belosevic M. Comparison of receptors required for entry of Leishmania major amastigotes into macrophages. *Infect. Immun.* 1993;61:1553-8.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988;52:269-79.
- Hawlish H, Belkaid Y, Baelder R, Hildeman D, Gerard C, Kohl J. C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. *Immunity.* 2005;22:415-26.
- Hawn TR, Ozinsky A, Underhill DM, Buckner FS, Akira S, Aderem A. Leishmania major activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. *Microbes. Infect.* 2002;4:763-71.
- Heinzel FP. Interleukin 12 and the regulation of CD4⁺ T-cell subset responses during murine Leishmaniasis. *Parasitol. Today* 1994;10:190-2.
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med* 1989;169:59-72.
- Hernandez MX, Barcante TA, Vilela L, Tafuri WL, Afonso LC, Vieira LQ. Vaccine-induced protection against Leishmania amazonensis is obtained in the absence of IL-12/23p40. *Immunol Lett.* 2006;105:38-47.
- Hijiya N, Miyake K, Akashi S, Matsuura K, Higuchi Y, Yamamoto S. Possible involvement of toll-like receptor 4 in endothelial cell activation of larger vessels in response to lipopolysaccharide. *Pathobiology* 2002;70:18-25.
- Ho JL, He SH, Rios MJ, Wick EA. Interleukin-4 inhibits human macrophage activation by tumor necrosis factor, granulocyte-monocyte colony-stimulating factor, and interleukin-3 for antileishmanial activity and oxidative burst capacity. *J. Infect. Dis.* 1992;165:344-51.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284:1313-8.

- Holaday BJ, Sadick MD, Wang ZE, Reiner SL, Heinzl FP, Parslow TG, Locksley RM. Reconstitution of Leishmania immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1- and Th2-like cell lines. *J. Immunol* 1991;147:1653-8.
- Hondowicz B, Scott P. Influence of host and parasite factors on the innate immune response and Th2 stability following infection with *Leishmania major*. *Microbes. Infect.* 1999;1:65-71.
- Huang FP, Niedbala W, Wei XQ, Xu D, Feng GJ, Robinson JH, Lam C, Liew FY. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur. J. Immunol* 1998;28:4062-70.
- Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhaes AL, Guerra junior RB, Melo MN, Gomes R, Silveira TG, Shaw JJ. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002;96 Suppl 1:S111-S121.
- Ishikawa H, Hisaeda H, Taniguchi M, Nakayama T, Sakai T, Maekawa Y, Nakano Y, Zhang M, Zhang T, Nishitani M, Takashima M, Himeno K. CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int. Immunol* 2000;12:1267-74.
- Ito T, Schaller M, Hogaboam CM, Standiford TJ, Sandor M, Lukacs NW, Chensue SW, Kunkel SL. TLR9 regulates the mycobacteria-elicited pulmonary granulomatous immune response in mice through DC-derived Notch ligand delta-like 4. *J. Clin. Invest* 2009;119:33-46.
- Jacobs T, Andra J, Gaworski I, Graefe S, Mellenthin K, Kromer M, Halter R, Borlak J, Clos J. Complement C3 is required for the progression of cutaneous lesions and neutrophil attraction in *Leishmania major* infection. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 2005;194:143-9.
- Jakob T, Udey MC. Epidermal Langerhans cells: from neurons to nature's adjuvants. *Adv. Dermatol.* 1999;14:209-58.
- Jarrousse V, Quereux G, Marques-Briand S, Knol AC, Khammari A, Dreno B. Toll-like receptors 2, 4 and 9 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome). *Eur. J. Dermatol.* 2006;16:636-41.
- Kavoosi G, Ardestani SK, Kariminia A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology* 2009a;136:1193-9.
- Kavoosi G, Ardestani SK, Kariminia A, Alimohammadian MH. *Leishmania major* lipophosphoglycan: Discrepancy in toll-like receptor signaling. *Exp. Parasitol.* 2009b;
- Kedzierski L, Montgomery J, Curtis J, Handman E. Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 2004;52:104-12.
- Kerr SF. Molecular trees of trypanosomes incongruent with fossil records of hosts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006;101:25-30.

- Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 1999;17:279-89.
- Kim GT, Cho ML, Park YE, Yoo WH, Kim JH, Oh HJ, Kim DS, Baek SH, Lee SH, Lee JH, Kim HY, Kim SI. Expression of TLR2, TLR4, and TLR9 in dermatomyositis and polymyositis. *Clin Rheumatol.* 2010;29:273-9.
- Kox M, van Velzen JF, Pompe JC, Hoedemaekers CW, van der Hoeven JG, Pickkers P. GTS-21 inhibits pro-inflammatory cytokine release independent of the Toll-like receptor stimulated via a transcriptional mechanism involving JAK2 activation. *Biochem. Pharmacol.* 2009;78:863-72.
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazi S, Galanos C, Smith DF, Muller I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 2004a;72:1920-8.
- Kropf P, Freudenberg N, Kalis C, Modolell M, Herath S, Galanos C, Freudenberg M, Muller I. Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. *J. Leukoc. Biol.* 2004b;76:48-57.
- Ku JK, Kwon HJ, Kim MY, Kang H, Song PI, Armstrong CA, Ansel JC, Kim HO, Park YM. Expression of Toll-like receptors in verruca and molluscum contagiosum. *J Korean Med. Sci.* 2008;23:307-14.
- Lange UG, Mastroeni P, Blackwell JM, Stober CB. DNA-Salmonella enterica serovar Typhimurium primer-booster vaccination biases towards T helper 1 responses and enhances protection against *Leishmania major* infection in mice. *Infect. Immun.* 2004;72:4924-8.
- Larson EE, Marsden PD. The origin of espundia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987;81:880.
- Launois P, Maillard I, Pingel S, Swihart KG, Xenarios I, cha-Orbea H, Diggelmann H, Locksley RM, MacDonald HR, Louis JA. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity.* 1997a;6:541-9.
- Launois P, Swihart KG, Milon G, Louis JA. Early production of IL-4 in susceptible mice infected with *Leishmania major* rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *J. Immunol.* 1997b;158:3317-24.
- Li J, Chen J, Tan Z, Liu H, Liu Z. Expression of TLR9 and its mRNA in the lesions of lichen planus. *J. Huazhong. Univ Sci. Technol. Med. Sci.* 2007;27:203-5.
- Li Y, Ishii K, Hisaeda H, Hamano S, Zhang M, Nakanishi K, Yoshimoto T, Hemmi H, Takeda K, Akira S, Iwakura Y, Himeno K. IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther.* 2004;11:941-8.

- Locksley RM, Heinzel FP, Fankhauser JE, Nelson CS, Sadick MD. Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. *Infect. Immun.* 1988;56:332-42.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1986;80:859-76.
- Martin-Armas M, Simon-Santamaria J, Pettersen I, Moens U, Smedsrod B, Sveinbjornsson B. Toll-like receptor 9 (TLR9) is present in murine liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and mediates the effect of CpG-oligonucleotides. *J Hepatol.* 2006;44:939-46.
- Matlaszewski G. Leishmania infection and virulence. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 2001;190:37-42.
- Mattner J, Donhauser N, Werner-Felmayer G, Bogdan C. NKT cells mediate organ-specific resistance against Leishmania major infection. *Microbes Infect.* 2006;8:354-62.
- McConville MJ, Collidge TA, Ferguson MA, Schneider P. The glycoinositol phospholipids of Leishmania mexicana promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 1993;268:15595-604.
- McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of Leishmania lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem. J.* 1995;310 (Pt 3):807-18.
- McMaster WR, Morrison CJ, MacDonald MH, Joshi PB. Mutational and functional analysis of the Leishmania surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology* 1994;108 Suppl:S29-S36.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 2000;8:452-6.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997a;91:295-8.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997b;388:394-7.
- Meymandi S, Dabiri S, Dabiri D, Crawford RI, Kharazmi A. A quantitative study of epidermal Langerhans cells in cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania tropica. *Int. J. Dermatol.* 2004;43:819-23.
- Miller LS, Sorensen OE, Liu PT, Jalian HR, Eshtiaghpour D, Behmanesh BE, Chung W, Starner TD, Kim J, Sieling PA, Ganz T, Modlin RL. TGF-alpha regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol.* 2005;174:6137-43.
- Mo IF, Yip KH, Chan WK, Law HK, Lau YL, Chan GC. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *BMC. Cell Biol.* 2008;9:52.

- Mosser DM, Brittingham A. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* 1997;115 Suppl:S9-23.
- Mosser DM, Burke SK, Coutavas EE, Wedgwood JF, Edelson PJ. Leishmania species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Exp. Parasitol.* 1986;62:394-404.
- Mosser DM, Edelson PJ. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotes. *J. Immunol.* 1985a;135:2785-9.
- Mosser DM, Edelson PJ. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of Leishmania major. *Nature* 1987;327:329-31.
- Mosser DM, Wedgwood JF, Edelson PJ. Leishmania amastigotes: resistance to complement-mediated lysis is not due to a failure to fix C3. *J. Immunol.* 1985b;134:4128-31.
- Muller I, Freudenberg M, Kropf P, Kiderlen AF, Galanos C. Leishmania major infection in C57BL/10 mice differing at the Lps locus: a new non-healing phenotype. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 1997;186:75-81.
- Mun HS, Aosai F, Norose K, Chen M, Piao LX, Takeuchi O, Akira S, Ishikura H, Yano A. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against Toxoplasma gondii infection. *Int. Immunol.* 2003;15:1081-7.
- Muraille E, De TC, Brait M, De BP, Leo O, Carlier Y. Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to Leishmania major infection associated with a polarized Th2 response. *J. Immunol.* 2003;170:4237-41.
- Murray HW, Tsai CW, Liu J, Ma X. Responses to Leishmania donovani in mice deficient in interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. *Infect. Immun.* 2006;74:4370-4.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2000;97:13766-71.
- Pivarcsi A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-Szabo A, Koreck A, Szell M, Beer Z, Bata-Csorgoo Z, Magocsi M, Rajnavolgyi E, Dobozy A, Kemeny L. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int. Immunol.* 2003;15:721-30.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van HC, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-8.
- Poltorak A, Smirnova I, Clisch R, Beutler B. Limits of a deletion spanning Tlr4 in C57BL/10ScCr mice. *J. Endotoxin. Res.* 2000;6:51-6.

- Puentes SM, Dwyer DM, Bates PA, Joiner KA. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.* 1989;143:3743-9.
- Puig M, Grajkowski A, Boczkowska M, Ausin C, Beaucage SL, Verthelyi D. Use of thermolytic protective groups to prevent G-tetrad formation in CpG ODN type D: structural studies and immunomodulatory activity in primates. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:6488-95.
- Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* 1999;189:615-25.
- Ribeiro-Gomes FL, Moniz-de-Souza MC, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, Lungarella G, DosReis GA. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J. Immunol* 2007;179:3988-94.
- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 2001;65:456-65.
- Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO, Shaw JJ. The rarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med Parasitol.* 2002;96:131-6.
- Ruiz MR, Quinones AG, Diaz NL, Tapia FJ. Acute immobilization stress induces clinical and neuroimmunological alterations in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Br. J. Dermatol.* 2003;149:731-8.
- Russell DG, Wright SD. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. *J. Exp. Med.* 1988;168:279-92.
- Sakai T, Hisaeda H, Ishikawa H, Maekawa Y, Zhang M, Nakao Y, Takeuchi T, Matsumoto K, Good RA, Himeno K. Expression and role of heat-shock protein 65 (HSP65) in macrophages during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of HSP65 in prevention of apoptosis of macrophages. *Microbes Infect.* 1999;1:419-27.
- Satta N, Kruithof EK, Reber G, de MP. Induction of TLR2 expression by inflammatory stimuli is required for endothelial cell responses to lipopeptides. *Mol. Immunol.* 2008;46:145-57.
- Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denkers EY, Medzhitov R, Sher A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 2002;168:5997-6001.
- Scharton-Kersten T, Scott P. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *J. Leukoc. Biol.* 1995;57:515-22.

- Shah JA, Darrah PA, Ambrozak DR, Turon TN, Mendez S, Kirman J, Wu CY, Glaichenhaus N, Seder RA. Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med* 2003;198:281-91.
- Shi Z, Cai Z, Wen S, Chen C, Gendron C, Sanchez A, Patterson K, Fu S, Yang J, Wildman D, Finnell RH, Zhang D. Transcriptional regulation of the novel Toll-like receptor Tlr13. *J Biol. Chem.* 2009;284:20540-7.
- Song PI, Park YM, Abraham T, Harten B, Zivony A, Neparidze N, Armstrong CA, Ansel JC. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol.* 2002;119:424-32.
- Spath GF, Lye LF, Segawa H, Sacks DL, Turco SJ, Beverley SM. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. *Science* 2003;301:1241-3.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999;11:443-51.
- Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Sanchez MA, Fernandez CT, Rondon AJ, Convit J. Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. *Exp. Dermatol.* 1994;3:17-22.
- Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides. *J Immunol.* 2000;165:5780-7.
- Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Sierra Romero GA. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop. Med Int. Health* 2006;11:1388-98.
- Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, Almusawi T, Duarte MI, Amato N, V. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect. Immun.* 2008a;76:866-72.
- Tuon FF, Amato VS, Floeter-Winter LM, Zampieri RA, Amato N, V, Franca FO, Shikanai-Yasuda MA. Cutaneous leishmaniasis reactivation 2 years after treatment caused by systemic corticosteroids – first report. *Int. J. Dermatol.* 2007;46:628-30.
- Tuon FF, Duarte MI, Amato VS. A quantitative and morphometric study of mast cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2008b;30:641-5.
- Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MI, Neto VA, Amato VS. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clin. Immunol.* 2008c;128:442-6.
- Tuon FF, Guedes F, Fernandes ER, Pagliari C, Amato VS, Seixas Duarte MI. In situ immune responses to interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009;31:98-103.
- Tuon FF, Neto VA, Amato VS. *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008d;54:158-66.

- Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1994;41:324-30.
- Vasconcelos IA, Vasconcelos AW, Momen H, Grimaldi G, Jr., Alencar JE. Epidemiological studies on American leishmaniasis in Ceara State, Brazil. Molecular characterization of the *Leishmania* isolates. *Ann. Trop. Med Parasitol.* 1988;82:547-54.
- Weinheber N, Wolfram M, Harbecke D, Aebischer T. Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. *Eur. J. Immunol.* 1998;28:2467-77.
- Whitaker SM, Colmenares M, Pestana KG, Mahon-Pratt D. *Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* 2008;76:2149-56.
- Wilson ME, Recker TJ, Rodriguez NE, Young BM, Burnell KK, Streit JA, Kline JN. The TGF-beta response to *Leishmania chagasi* in the absence of IL-12. *Eur. J. Immunol* 2002;32:3556-65.
- Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, Waisman A, Nigg AP, Knop J, Udey MC, von SE. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcgamma receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J. Exp. Med* 2006;203:177-88.
- Xavier MB, Silveira FT, Demachki S, Ferreira MM, do Nascimento JL. American tegumentary leishmaniasis: a quantitative analysis of Langerhans cells presents important differences between *L. (L.) amazonensis* and *Viannia* subgenus. *Acta Trop.* 2005;95:67-73.
- Xia M, Hu G, Zhang H, Liu F, Xu A. Down-regulation of toll-like receptor 4 in the granulation tissues of postoperative mastoid cavities with otorrhea. *Acta Otolaryngol* 2008;128:1077-84.
- Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003;132:1-16.
- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 1999;163:1-5.
- Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc. Res.* 2002;56:126-34.