

**Avaliação do papel de receptores similares a Toll (toll-like receptors) na produção de citocinas por células mononucleares humanas expostas a *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Lívia Lara Pessoni<sup>1</sup>, Anetícia Eduarda Maldaner, Hélio Galdino Júnior, Camila Imai Morato, Milton Adriano Pelli de Oliveira, Fátima Ribeiro-Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, 74650-050

e-mail: liviapessoni@hotmail.com, [fatimardias@gmail.com.br](mailto:fatimardias@gmail.com.br)

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose, Toll Like Receptors, fator de necrose tumoral, interleucina-10

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Mais de 20 espécies e subespécies de *Leishmania* infectam seres humanos, causando doenças que podem ser amplamente divididas em leishmaniose cutânea, mucosa e visceral (Bertholet et al., 2009). Mais de 10 milhões de pessoas em todo o mundo estão atualmente infectados por *Leishmania* sp. Na América do Sul, o Brasil é o país com a maior ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), com mais de 25.000 casos por ano (Brasil, 2007; Guerra et al., 2010). A infecção por este parasito continua sendo um problema de saúde pública em países subdesenvolvidos e é uma preocupação constante nos países desenvolvidos, devido à possibilidade dos turistas, que retornam de países endêmicos, contraírem a doença (Tuon et al., 2008).

A infecção ocorre quando o inseto vetor, uma fêmea de flebotomíneo, contendo a forma flagelada promastigota metacíclica do parasito, realiza o repasto sanguíneo na pele do hospedeiro vertebrado. Essas formas promastigotas são internalizadas por células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente os macrófagos, transformando-se nas formas amastigotas, que se multiplicam continuamente (Bertholet et al., 2009). Após o contato dos parasitos com os macrófagos, ocorre a produção do fator de necrose tumoral (TNF), que é uma citocina pró-inflamatória, envolvida principalmente na resposta imune natural, tendo um papel central na defesa contra patógenos intracelulares. O TNF é produzido principalmente

Revisado pela orientadora prof. Dra. Fátima Ribeiro Dias. Orientanda Lívia Lara Pessoni.

Colaboradores: Anetícia Eduarda Maldaner, bolsista de iniciação científica; Hélio Galdino Júnior, doutorando; Camila Imai Morato, mestranda; e Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, colaborador.

por macrófagos ou monócitos ativados (Vassalli, 1992) e age estimulando outras células do sistema imune a produzirem citocinas e outros mediadores, como o óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que promovem a morte de patógenos e a injúria tecidual (Bradley, 2008). Assim, o TNF pode ajudar na eliminação dos parasitos *Leishmania* sp, auxiliando no controle da infecção, mas pode também exacerbar a lesão tecidual causada pela infecção, dificultando a cura das lesões. Além de induzir a produção de TNF, *Leishmania* sp também induz a produção de citocina antiinflamatória e imunossupressora, como a interleucina 10 (IL-10). Embora esta citocina possa ser importante para o controle da inflamação, auxiliando na cura da lesão, por ser imunossupressora e inibidora da atividade microbicida dos macrófagos, ela também pode exacerbar o crescimento dos parasitos dificultando sua eliminação (Saraiva & O'garra, 2010).

A infecção de camundongos da linhagem C57BL/6 por *L. major* revelou que estes desenvolvem lesões locais, que curam após algumas semanas. Essa resistência à infecção foi associada a uma resposta do tipo 1 (T helper 1) com desenvolvimento de células T CD4+ produtoras de interferon gama (IFN $\gamma$ ) e TNF. Já em camundongos da linhagem BALB/c, foi observada uma suscetibilidade à infecção, sendo que estes camundongos desenvolvem lesões persistentes, progressivas, podendo ocorrer a disseminação dos parasitos para os órgãos viscerais. Essa resposta imune ineficiente para o controle da doença foi associada a uma prevalência da resposta do tipo 2 (T helper 2) com desenvolvimento de células T CD4+ produtoras de interleucina 4, 10 e 13 (IL-4, IL-10 e IL-13) (Bertholet et al., 2009; Liese et al, 2008). Portanto, o balanço na produção de citocinas pro e antiinflamatórias é muito importante para a resolução da infecção.

Em pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL), uma forma mais branda da LTA, foi demonstrada uma correlação positiva entre o número de monócitos do sangue periférico produzindo TNF e IL-10, já naqueles com acometimento da mucosa (LM, associado a lesões mais graves), esta correlação não existe, sugerindo que haja um desequilíbrio na produção de TNF e IL-10, favorecendo uma reação inflamatória exacerbada (Gaze et al., 2006). Na forma mais grave da LTA, causada especialmente por *L. (Viannia) braziliensis*, a leishmaniose cutaneomucosa (LCM), os pacientes apresentam forte resposta imune celular, com intensa produção de IFN $\gamma$  e TNF, em paralelo a uma progressiva destruição tecidual (Convit et al., 1993; D'Oliveira Jr. et al, 2002).

A capacidade das espécies de *Leishmania*, nos momentos iniciais da infecção, de invadir e sobreviver dentro das células do hospedeiro envolve a interação de moléculas presentes na superfície do parasito com receptores nos macrófagos (Guerra et al., 2010). Os membros da família dos receptores similares a proteína *Toll* (TLR) são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como glicolipídeos, peptidoglicanos e lipopeptídeos, que são compartilhados por grandes grupos de microrganismos. A ativação de macrófagos via TLRs aciona a via do NFκB, um fator de transcrição que regula a expressão de citocinas pro-inflamatórias como TNF-α e IL-12, e também a produção de NO e ROS (Kavoosi et al., 2009; Bhattacharya et al., 2010). Treze TLRs têm sido relatados em seres humanos e camundongos (Kavoosi et al., 2009). de Veer et al. (2003) demonstraram que TLR2 é acionado por glicolipídeos presentes na membrana de *Leishmania* sp e que outras moléculas estruturais de *Leishmania* podem também ativar outros TLR (Tuon et AL., 2008). Durante a infecção por *Leishmania donovani*, o parasito modula as respostas via TLR2 e TLR4, suprimindo a produção de IL-12 e aumentando a produção de IL-10, o que sugere que *L. donovani* possui mecanismos moduladores das respostas inflamatórias induzidas via TLRs (Chandra e Naiki, 2008).

Antoniazi et al (2004) demonstraram que a ativação da NO sintase induzida (iNOS) leva à síntese de NO e morte de *L. major*, porém, na ausência do TLR4, a atividade mais intensa da arginase aumenta a formação de uréia e reduz a formação de NO. Estudos comparando camundongos C57BL10/ScN com uma mutação no gene TLR4, com camundongos TLR4-competente (C57BL/10ScSn), demonstraram que as cargas parasitárias eram significativamente mais altas nos camundongos deficientes em TLR4. A ativação de TLR4 durante a imunoterapia da leishmaniose tem sido associada com um aumento na taxa de cura em modelos animais. Além disso, estudos recentes sugeriram que os TLRs estão envolvidos em uma variedade de funções dos macrófagos, incluindo a fagocitose, a maturação e a atividade microbicida nos fagossomos (Flandin et al. 2006).

Avaliar se *L. (Viannia) braziliensis* ativa TLRs é relevante, visto o importante papel que os TLRs têm na resposta imune inata e esta, por sua vez, pode influenciar a resposta imune adaptativa e, conseqüentemente, o fenótipo da doença.

## 2 OBJETIVO

Avaliar se formas amastigotas do isolado *L. (V.) braziliensis* IMG3 são capazes de induzir TNF e IL-10 em culturas de células mononucleares de indivíduos sadios e se receptores TLR2 e TLR4 estão envolvidos nesta indução.

## 3 METODOLOGIA

**3.1 Obtenção do sangue periférico humano:** Foram incluídos doadores sadios, maiores de 18 anos. O sangue venoso foi colhido em tubos vacutainer (BD Vacutainer<sup>TM</sup>, Juiz de Fora, MG, Brasil), contendo EDTA como anticoagulante. Os indivíduos sadios (Doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas/UFG e Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia) leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, antes de doarem o sangue. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, protocolo 165/08.

**3.2 Obtenção de células mononucleares (CMN) do sangue:** O sangue foi centrifugado (114g, 15 min, temperatura ambiente (T.a.)). O plasma foi descartado e o sangue diluído (v/v) em solução de EDTA 0,01 M em salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,3 (PBS-EDTA) e aplicado sobre gradiente de densidade (Ficoll, GE Healthcare). Após centrifugação (1500g, 15 min, T.a.), o anel de CMN foi colhido e as células foram lavadas duas vezes em solução de PBS-EDTA (sendo a primeira centrifugação 700g, 10 min, T.a e a segunda 200g, 10 min, T.a). As CMN foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MD, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco, Brasil), 2 mM de L-glutamina, 11 mM de bicarbonato de Sódio, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), referido como meio completo. A viabilidade celular foi avaliada com azul tripan 0,01% em PBS, sendo as células usadas somente quando a viabilidade foi maior do que 90%. As CMN foram quantificadas e distribuídas ( $2 \times 10^6$  células/mL; volume final 400 µL) em placas de 24 poços (Corning Costar).

**3.3 Cultivo dos parasitos e obtenção das formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*:** O isolado MHOM/BR/2003/IMG, obtido de lesões cutâneas de um paciente com LCL (*Leishbank* IPTSP/UFG), foi cultivado em meio Grace (Grace's Insect Medium, Sigma Chemical Co., St Louis, MD, EUA) suplementado com 20% de SFB (Gibco) inativado, 2 mM de L-glutamina (Sigma), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), sendo assim, considerado meio completo. Para infecção, os parasitos, na fase

estacionária do crescimento (6 dias), foram lavados em PBS (1500g, 15 min, 10°C) três vezes e depois quantificados em hematocítômetro, após fixação em formalina 0,1%. Os parasitos foram inoculados ( $5 \times 10^6$ ) nas patas traseiras de camundongos C57BL/6 deficientes em interferon gama (INF $\gamma$ ), para a obtenção das formas amastigotas. Após o desenvolvimento das lesões, cerca de 3-4 semanas, os camundongos infectados foram eutanasiados e as lesões foram retiradas. As lesões foram maceradas em PBS pH 7,2 e o sobrenadante centrifugado (114g, 5 min, 10°C) para retirar os fragmentos do tecido. Em seguida, foi feita nova centrifugação (1500g, 15 min, 10°C), sendo os parasitos ressuspensos em 1 mL de solução de lise de hemácias (90%NH<sub>4</sub>Cl 0,16M; 10%Tris 0,17M), homogeneizados e reservados por 3 minutos. Foram adicionados aos parasitos 7 mL de PBS pH 7,2 e nova centrifugação foi feita (1500g, 15 min, 10°C). Posteriormente, os parasitos foram ressuspensos em 1 mL PBS pH 7,2, acrescentou-se 900  $\mu$ L de Percoll 100%, a solução foi homogeneizada, sobreposta de 1 mL de Percoll 44% e 1 mL de PBS pH 7,2. Após centrifugação (2500g, 30 min, 10°C), foram obtidos dois anéis e as formas amastigotas foram recuperadas do anel de Percoll 100%. Em seguida as formas amastigotas foram lavadas em PBS (2500g, 20 min, 10°C), ressuspensas em 1 mL de PBS, e uma alíquota (10  $\mu$ L) foi retirada, fixada com solução formalina 0,1% para quantificação e posterior infecção das CMN.

**3.4 Culturas de CMN e tratamentos:** As CMN foram cultivadas ou não com IFN $\gamma$ -humano (100 U/mL, Preprotech, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 24 h, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após, as CMN foram incubadas com as formas amastigotas ( $3 \times 10^5$  parasitos/poço), na presença ou na ausência de anticorpos neutralizantes de TLR2 (4  $\mu$ g/mL) (TL2.1, InvivoGen, San Diego, CA, EUA) ou de TLR4 (4  $\mu$ g/mL) (HTA125, InvivoGen, San Diego, CA, EUA). O tratamento com os anticorpos foi feito 30 minutos antes da adição das formas amastigotas. As CMN não infectadas também foram tratadas com os agonistas de TLR4 (lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* 0111:B4, Sigma; 100 ng/mL) ou de TLR2 (Pam<sub>3</sub>Cys SKKKK, EMC, Tübingen, Alemanha; 1  $\mu$ g/mL). Após 24 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), os sobrenadantes foram colhidos e congelados para dosagens de citocinas.

**3.5 Dosagens de TNF e IL-10 por ensaio imunoenzimático (ELISA sanduíche):** As citocinas foram dosadas nos sobrenadantes de cultura. As microplacas para ELISA (Corning Costar, NY, EUA) foram sensibilizadas com o primeiro anticorpo anti-TNF (2,5  $\mu$ g/mL, clone B 154.9, 1 h 30min, 37°C) e para detecção de IL-10, anticorpo monoclonal de cobertura anti-IL-10 (Hibridoma JES907, 5  $\mu$ g/mL, 18 h, 4°C ou 2h, 37°C). Após incubação, foram realizadas lavagens com PBS-tween 20 a 0,04 % e as placas foram bloqueadas (PBS 3% de

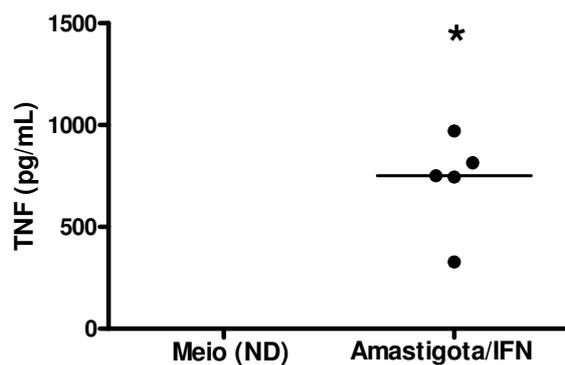
SFB; 40 min, T.a.). Em seguida, foram adicionadas as amostras. Após incubação (cerca de 18 h, 4°C) e lavagens com PBS-tween 20 a 0,04 %, foi adicionado o segundo anticorpo conjugado a biotina (Clone B154.7 anti-TNF 1 µg/mL; Clone B27 anti-IL-10, 2,6 µg/mL.). Após incubação (1 h, T.a.) e lavagens, foi acrescentado o conjugado estreptoavidina-peroxidase (Sigma, 1:1000) e, após incubação (30 min, T.a.) e lavagens, a solução substrato OPD (ortofenilenodiamina, 5 mg/mL e peróxido de hidrogênio 30 Volumes 1:1000, diluídos em tampão citrato-fosfato, pH 5,0) foi adicionada. A reação foi finalizada com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N e a densidade óptica foi obtida em um leitor (Multskam, Thermo LabSystems) com filtros de 492 nm e referência 620 nm. A concentração das citocinas foi determinada de acordo com as curvas padrões preparadas com cada citocina recombinante (R&D System, Mineápolis, MN, EUA), com o limite de detecção de 25 pg/mL (IL-10) a 100 pg/mL (TNF).

**3.6 Análises estatísticas:** Os dados são apresentados como mediana e valores mínimo e máximo (mediana [valor mínimo - valor máximo]), sendo avaliados pelo teste de Mann Whitney. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

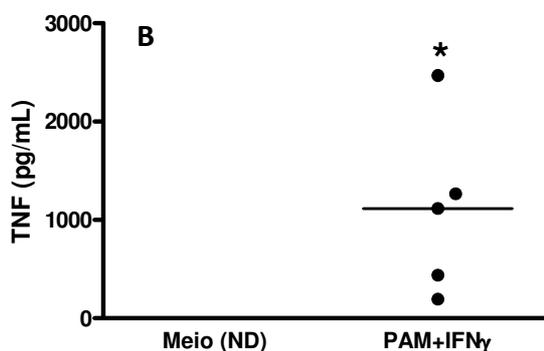
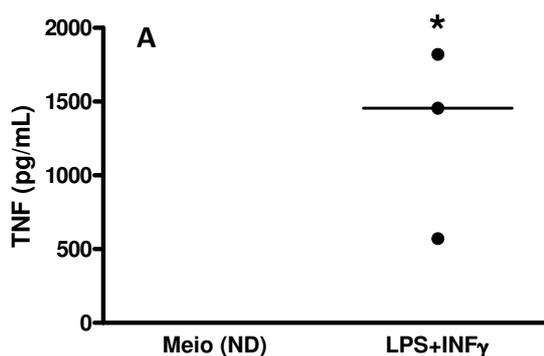
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3 induzem produção de TNF, mas não IL-10 por células mononucleares tratadas com interferon gama

As CMN obtidas do sangue periférico de doadores sadios foram cultivadas por 24 horas na ausência ou na presença de IFN $\gamma$  (100 U/mL), sendo em seguida co-cultivadas ou não com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3. Como observado na Figura 1, o co-cultivo das CMN com as formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3 induziu um aumento estatisticamente significativo na produção de TNF (IFN $\gamma$ /amastigotas: 752,0 [328,0 – 972,0] pg/mL x Meio: não detectado,  $p < 0,05$ ). Quando as células foram cultivadas na ausência de IFN $\gamma$ , o TNF não foi detectado nas culturas. Como controle, o LPS e o Pam<sub>3</sub>Cys foram adicionados às CMN pré-sensibilizadas com IFN $\gamma$  e estes induziram significativa produção de TNF (LPS/ IFN $\gamma$ : 1.456,0 [571,0 – 1.820,0] x Meio: não detectado,  $p < 0,05$ , Figura 2A; Pam<sub>3</sub>Cys /IFN $\gamma$ : 1.117,0 [193,0 – 2.469,0] x Meio: não detectado,  $p < 0,05$ , Figura 2B).

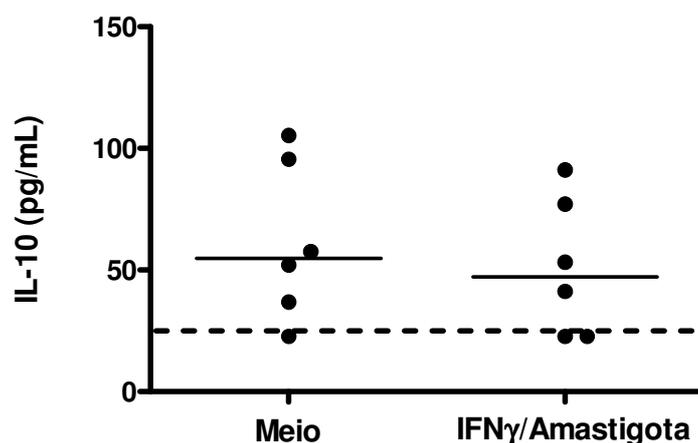


**Figura 1. Avaliação da produção de TNF por células mononucleares, na ausência ou na presença de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3.** As CMN ( $1 \times 10^6$  células/poço), na ausência (Meio) ou na presença (Amastigotas/IFN $\gamma$ ) de formas amastigotas ( $3 \times 10^5$  parasitos/poço), foram cultivadas por 24 h. Os sobrenadantes foram colhidos e as concentrações de TNF foram mensuradas pelo método de ELISA. São apresentados os valores individuais e a mediana (n = 5). ND: não detectado.

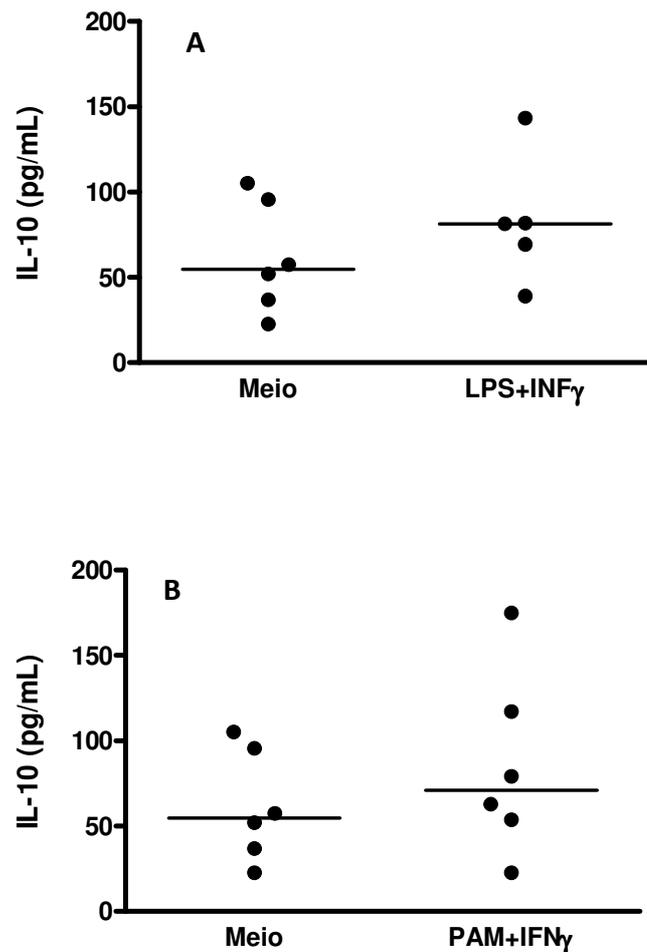


**Figura 2 - Indução da produção de TNF por agonista de TLR em células mononucleares.** As CMN ( $1 \times 10^6$  células/poço), na ausência (Meio) ou na presença de INF $\gamma$  e LPS (A) ou de Pam<sub>3</sub>Cys (B). Após incubação por 24h os sobrenadantes foram colhidos e as concentrações de TNF foram mensuradas pelo método de ELISA. São apresentados os valores individuais e as medianas (n = 4 - 5). ND: não detectado. PAM: Pam<sub>3</sub>Cys

As CMN foram cultivadas nas mesmas condições descritas acima e foi avaliada a produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas. Como observado na Figura 3, as formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3 não induziram a produção de IL-10 por CMN, independente de sensibilização com IFN $\gamma$  (Meio: 54,8 [22,7 – 105,3] pg/mL x IFN $\gamma$ /amastigotas: 47,2 [22,7 – 91,2] pg/mL). O LPS e o Pam<sub>3</sub>Cys adicionados às CMN sensibilizadas com IFN $\gamma$  induziram baixas quantidades de IL-10 (Meio: 54,8 [22,7 - 105,3] pg/mL x LPS/IFN $\gamma$ : 81,4 [39,0 – 143,3] pg/mL, Figura 4A; Meio: 54,8 [22,7 - 105,3] pg/mL x Pam<sub>3</sub>Cys /IFN $\gamma$ : 71,1 [22,7 – 174,9] pg/mL , Figura 4B).



**Figura 3. Avaliação da produção de IL-10 por células mononucleares, na ausência ou na presença de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3.** As CMN ( $1 \times 10^6$  células/poço), na ausência (Meio) ou na presença (IFN $\gamma$ /Amastigota) de formas amastigotas ( $3 \times 10^5$  parasitos/poço), foram cultivadas por 24 h. Os sobrenadantes foram colhidos e as concentrações de IL-10 foram mensuradas pelo método de ELISA. São apresentados os valores individuais e as medianas (n = 6). A linha pontilhada representa o limiar de detecção da citocina.

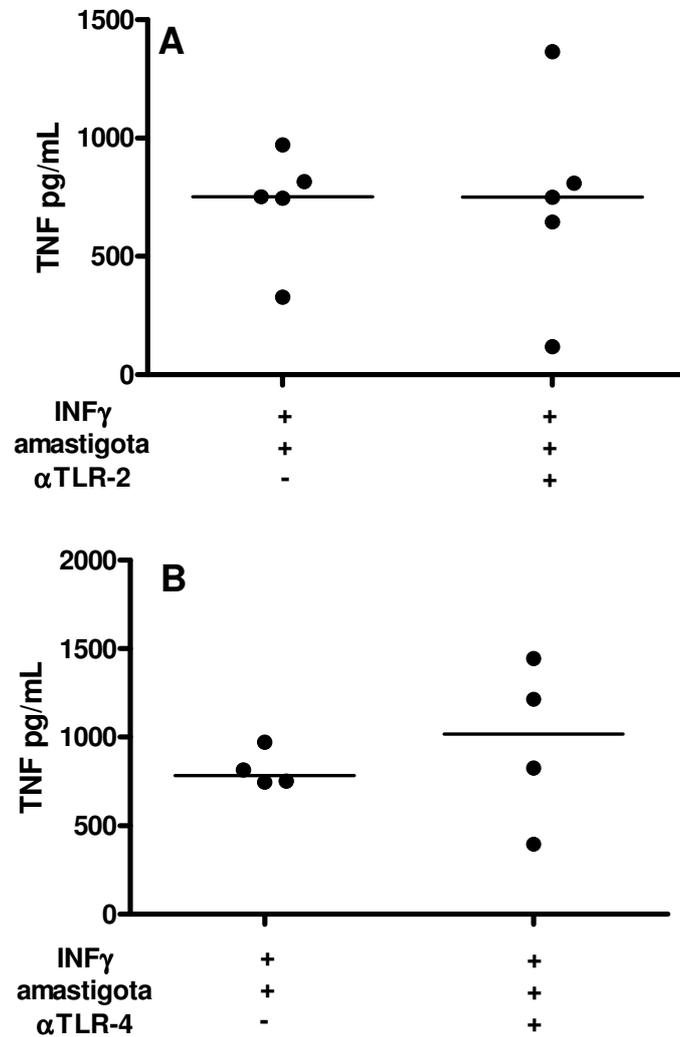


**Figura 4 - Indução da produção de IL-10 por agonista de TLR em células mononucleares.** As CMN ( $1 \times 10^6$  células/poço), na ausência (Meio) ou na presença de INF $\gamma$  e LPS (A) ou de Pam<sub>3</sub>Cys (B). Após incubação por 24h, os sobrenadantes foram colhidos e as concentrações de TNF foram mensuradas pelo método de ELISA. São apresentados os valores individuais e as medianas (n = 6). PAM: Pam<sub>3</sub>Cys

#### 4.2 Avaliação da participação dos TLR2 e TLR4 na indução de TNF por formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3

As CMN, após incubação com INF $\gamma$  (100 U/mL) por 24 h, foram tratadas ou não com anticorpos bloqueadores de TLR2 ou TLR4, por 30 minutos. Após este período, as células foram co-cultivadas com formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3, por mais 24 horas. A Figura 5 mostra que o tratamento com anticorpos anti-TLR2 ou anti-TLR4 não alterou significativamente a produção de TNF induzida pelos parasitos (INF $\gamma$ /Amastigotas: 752,0 [328,0 - 972,0] pg/mL x INF $\gamma$ /Amastigotas/anti-TLR2: 750,0 [118,0 - 1.364,0] pg/mL; INF $\gamma$ /Amastigotas: 784,0 [745,0 - 972,0] x INF $\gamma$ /Amastigotas/anti-TLR4: 1.020,0 [396,0 -

1.444,0] pg/mL). Como não houve significativa indução de IL-10 nas culturas, o efeito dos anticorpos bloqueadores de TLRs na produção de IL-10 não pode ser mensurado.



**Figura 5. Avaliação do tratamento com anticorpos bloqueadores de TLR2 ( $\alpha$ TLR2) ou TLR4 ( $\alpha$ TLR4) na produção de TNF induzida por formas amastigotas *L. (V.) braziliensis* IMG3. As CMN ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com IFN $\gamma$  e formas amastigotas ( $3 \times 10^5$  parasitos/poço) na ausência ou na presença de anticorpos  $\alpha$ TLR2 (A) e  $\alpha$ TLR4 (B). A concentração de TNF foi mensurada por ELISA nos sobrenadantes das culturas após 24 h. São representados os valores individuais e as medianas (n = 4 - 5).**

## 5 DISCUSSÃO

Agonistas de TLR2 e TLR4 induzem a produção de TNF e IL-10 em CMN humanas (Farina et al., 2004; Brunialti et al., 2006). Aqui foi demonstrado que formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3 são capazes de induzir a produção de TNF quando as CMN são tratadas com IFN $\gamma$ . É conhecido que dentre as CMN, os monócitos são as principais células produtoras de TNF após ativação com agonistas de TLR2 e TLR4, especialmente quando estas células são pré-sensibilizadas com IFN $\gamma$  (Bosisio et al., 2002; Harter et al., 2004). Nossos dados preliminares sugerem que antígenos de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3 são capazes de induzir TNF em monócitos pré-sensibilizados com IFN $\gamma$ . A avaliação da participação de TLR2 e TLR4, nesta capacidade das formas amastigotas de induzir TNF, até o momento não é conclusiva porque foi usada uma única concentração dos anticorpos bloqueadores, portanto, é necessário realizar uma curva dose-resposta com os anticorpos para uma melhor avaliação. A fraca indução de IL-10 pelos agonistas de TLR2 e TLR4 nos nossos ensaios pode ser devida a uma baixa concentração destes agonistas ou uma necessidade de um maior tempo de incubação com estes estimuladores para que seja detectada a IL-10. Antígenos de *Leishmania* induzem baixas concentrações de IL-10 em culturas de CMN de pacientes com LTA, sendo fontes de IL-10 os linfócitos T CD4+ e os monócitos (Bacellar et al., 2002), portanto, a não indução de IL-10 nos experimentes do presente estudo pode também ser devido à fraca capacidade de *Leishmania* em induzir IL-10. Para conclusões, devemos aperfeiçoar as condições experimentais do presente estudo.

## 6 CONCLUSÕES:

- Formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* IMG3 induzem a produção de TNF, mas não a de IL-10, em CMN de indivíduos saudáveis, sendo a fonte de TNF provavelmente os monócitos.

- Os experimentos preliminares sugerem que os receptores TLR2 e TLR4 não estão envolvidos na indução do TNF pelas formas amastigotas, porém melhores condições experimentais devem ser atingidas antes que esta conclusão seja assumida.

**Apoio financeiro:** CNPq e CAPES

## 6 REFERÊNCIAS

- ANTONIAZI, 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*. **Infection and immunity**, v. 72, p. 5168–5174, 2004.
- BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, WO.; GOLLOB, KJ.; CARVALHO, EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and immunity**, v. 70, p. 6734-6740, 2002.
- BERTHOLET, S.; GOTO, Y.; CARTER, L.; BHATIA, A.; HOWARD, RF.; CARTER, D.; COLER, RN.; VEDVICK, TS.; REED, SG. Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. **National Institutes of Health**, v. 27, p. 7036-7045, 2009.
- 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. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, p. 145–155, 2010.
- BOSISIO, D.; POLENTARUTTI, N.; SIRONI, M.; BERNASCONI, S.; MIYAKE, K.; WEBB, GR.; MARTIN, MU.; MANTOVANI, A.; MUZIO, M. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-g: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. **American Society of Hematology**,, p. 3427-3431, 2002.
- BRADLEY, JR. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 149–160, 2008.
- BRASIL, MS. Secretaria de Vigilância em Saúde (2007) Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, Brasil: **Ministério da Saúde**. pp. 17
- BRUNIALTI, MKC.; MARTINS, PS.; CARVALHO de HB.; MACHADO, FR.; BARBOSA, LM.; SALOMÃO, R. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. **Shock**, v. 25, p. 351-357, 2006.

- CHANDRA, D.; NAIK, S. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 154, p. 224–234, 2009.
- CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNANDEZ, CT.; TAPIA, FJ.; CACERES-DITTMAR G.; CASTES, M.; RONDON, AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 444-448, 1993.
- D'OLIVEIRA, JRA.; MACHADO, P.; BACELLAR, O.; CHENG, LH.; ALMEIDA, RP.; CARVALHO. Evaluation of IFN $\gamma$  and TNF- $\alpha$  as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 7-10, 2002.
- DE VEER, MJ.; CURTIS, JM.; BALDWIN, TM.; DI DONATO, JA.; SEXTON, A.; MC CONVILLE, MJ.; HANDMAN, E.; SCHOFIELD, L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. **European Journal of Immunology**, v. 33, p. 2822–2831, 2003.
- FARINA, C.; THEIL, D.; SEMLINGER, B.; HOHFELD, R.; MEINL, E. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. **International Immunology**, v. 16, p. 799-809, 2004
- 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. **European Journal of Immunology**, v. 36, p. 411–420, 2006.
- GAZE, S.; DUTRA, WO.; LESSA M.; LESSA H.; GUIMARAES, LH.; MACHADO, P.; CARVALHO, EM.; GOLLOB, KJ. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. **Scandinavian Journal of Immunology**, v 63, p. 70-78, 2006.
- GUERRA, CS.; SILVA, RMM.; CARVALHO, LOP.; CALABRESE, KS.; BOZZA, PT.; CORTE-REAL, S. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. **International Journal of Experimental pathology**, v. 91, p. 451-459, 2010.
- HARTER, L.; MICA, L.; STOCKER, R.; TRENTZ, O.; KEEL, M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. **Shock**, v. 22 p. 403-409, 2004.

- KANE, MM.; MOSSER, DM. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, p. 26-3, 2000.
- 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**, v. 136, p. 1193–1199, 2009.
- KAVOOSI, G.; ARDESTANI, SK.; KARIMINIA, A.; ALIMOHAMMADIAN, MH. *Leishmania* major lipophosphoglycan: Discrepancy in toll-like receptor signaling. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 214–218, 2009.
- LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDA, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**, v. 213, p. 377–387, 2008.
- SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature**, v.10, p.170-180, 2010.
- TUON, FF.; AMATO, VS.; BACHA, HA.; ALMUSAWI, T.; DUARTE, MI.; NETO, VA. Toll-Like Receptors and Leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 76, p. 866–872, 2008.
- VASSALLI, P. The pathophysiology of TNF. **Annual review of immunology**, v. 10, p. 411-452, 1992.