

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES**

**Mestrado Acadêmico em Saúde Pública**

Amanda Ferreira de Almeida

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS TH17,  
TH1 E TH2 POR LINFÓCITOS T EM PACIENTES COM  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

**RECIFE**

**2013**

**Amanda Ferreira de Almeida**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS TH17, TH1 E TH2 POR  
LINFÓCITOS T EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

RECIFE

2013

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- A447a Almeida, Amanda Ferreira de.  
Avaliação da produção de citocinas Th17, Th1 e Th2 por linfócitos T em pacientes com leishmaniose tegumentar americana / Amanda Ferreira de Almeida. - Recife: s.n, 2013.  
81 p. : ilus., graf., tab.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.  
Orientador: Valéria Rêgo Alves Pereira.
1. Leishmaniose Cutânea. imunol. 2. Imunidade celular. 3. Citocinas. 4. Citometria de Fluxo. I. Pereira, Valéria Rêgo Alves. II. Título.

---

CDU 616.993.161

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS TH17, TH1 E TH2 POR  
LINFÓCITOS T EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 27/02/2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira  
Orientadora  
(Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ)

---

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Morais  
Examinadora Titular Interna  
(Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ)

---

Dra. Joelma Rodrigues de Souza  
Examinadora Titular Externa  
(Departamento de Fisiologia e Patologia - UFPB)

Aos meus pais, Uziel e Cristina, e à minha irmã Aline,  
À minha orientadora, Valéria, e aos meus colegas de laboratório,  
E a todos os pacientes com leishmaniose tegumentar.

## AGRADECIMENTOS

Aos pacientes portadores de leishmaniose, por concordaram em fazer parte deste estudo.

Aos meus pais, Uziel e Cristina, por todo o carinho e apoio dado ao longo desta jornada. Sem vocês eu não chegaria aqui.

À minha irmã, Aline, pelo carinho, convivência e momentos de descontração.

À minha orientadora, Valéria, pela oportunidade, paciência e pela confiança em meu trabalho. Sua orientação foi muito importante e levarei seus ensinamentos ao decorrer de toda a minha vida profissional.

A toda a equipe do laboratório de Imunogenética, Marina, Beatriz, Lucas, Aline, Thiago, Renan, Rossana e Amanda pelos momentos de descontração, pela convivência e pelo aprendizado cotidiano. Um agradecimento especial a Carolina, por todo o treinamento em citometria, pela ajuda nos experimentos e na redação de projetos e artigos, e em especial pela amizade. Um agradecimento especial também a Andresa e Thays, pela ajuda nos experimentos, ensinamentos e, sobretudo, pela amizade.

Aos meus colegas e amigos do mestrado acadêmico por todos os momentos de aprendizado, interdisciplinaridade e pelas alegrias.

Aos meus colegas do Colégio de Aplicação por todo o apoio dado ao longo deste trabalho, pela amizade e pela convivência.

A todos aqueles que contribuíram para este projeto através da doação de sangue.

Aos membros da banca examinadora da qualificação e da dissertação pela avaliação e pelas sugestões feitas com o intuito de melhorar a qualidade deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por toda a infraestrutura disponibilizada para a realização desse projeto.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charlie Chaplin)

ALMEIDA, A. F. Avaliação da produção de citocinas Th17, Th1 e Th2 por linfócitos T em pacientes com leishmaniose tegumentar americana. 2013. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

## RESUMO

As leishmanioses são um grave problema de saúde em todo o mundo e a forma cutânea é encontrada em todas as regiões do Brasil, sendo endêmica no estado de Pernambuco. Infecções por *Leishmania* levam à ativação da resposta imunológica no hospedeiro, destacando-se a resposta celular. Esta é caracterizada por expansão de vários tipos celulares, sobretudo de linfócitos T, com produção de diferentes perfis de citocinas. Este estudo teve como objetivo caracterizar imunofenotipicamente pacientes portadores de leishmaniose tegumentar ativa quanto à produção das citocinas IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4. Verificou-se a produção sérica de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 em pacientes com doença ativa (AT), após tratamento (PT) e de pacientes que apresentaram cura espontânea das lesões (CE). Buscou-se também a associação entre produção de citocinas na resposta imune celular de pacientes AT, relacionando a resposta imune dos perfis Th1, Th2 e Th17. Foi observada maior proporção de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, maior produção de IL-17 e IL-23 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e de IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em AT, em comparação aos controles, e também maior produção de IL-10 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> em AT. Os resultados revelaram maior concentração sérica de IL-6 em CE em comparação aos outros grupos. Além disso, observou-se associação positiva significativa entre citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4) em AT. Os resultados mostram que a proporção de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> é importante no processo de cura das lesões. O predomínio de citocinas Th2 na doença ativa sugere uma desregulação imunológica temporária inicial. No entanto, pode haver um favorecimento para a cura clínica nos pacientes que apresentam uma boa indução para a resposta Th17 com produção significativa de IL-6, como observado em CE. Portanto, um balanço adequado entre as respostas imunes no paciente pode ser o ideal para uma melhor resolução das patologias causadas *L. (V.) braziliensis*.

**Palavras-chave:** Leishmaniose cutânea, Imunidade celular, Citocinas, Citometria de fluxo.



ALMEIDA, A. F. Evaluation of the production of Th17, Th1 and Th2 cytokines by lymphocytes in patients with American cutaneous leishmaniasis. 2013. Dissertation (Master in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

### ABSTRACT

Leishmaniasis is a serious health problem in the world and the cutaneous form is found in all regions of Brazil, being endemic in the state of Pernambuco. *Leishmania* infections lead to an activation of the host immune response, mainly the cellular immune response. This response is characterized by expansion of various cell types, especially T lymphocytes, with production of different cytokine profiles. This study aimed to characterize immunophenotypically patients with active cutaneous leishmaniasis regarding the production of the cytokines IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-4. It also verified the serum production of IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-17 by patients with active lesions (AC) and after chemotherapy (PT), and patients with spontaneously healing lesions (SH). This project sought the association between the cytokine production in AC, specially relating the immune response by the Th1, Th2 and Th17 subsets. It was observed higher proportion of CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, higher production of IL-17 and IL-23 by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and of IL-4 by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in AC, when compared to controls, and also higher production of IL-10 by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in AC. The results showed a higher IL-6 serum concentration in SH in comparison to the other groups. Furthermore, it was observed a positive association between Th1 (IFN- $\gamma$ ) and Th2 (IL-4) cytokines in AC. Thus, the results observed demonstrate that CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes proportion is important in the lesion healing process. The predominance of Th2 cytokines in the active disease suggests an initial temporary immunologic deregulation. However, there may be a tendency to the clinical cure in patients presenting a good Th17 induction with significant IL-6 production. This was observed in SH. Therefore, an adequate balance between the immune responses in the patient can be the ideal for a better resolution of pathologies caused by *L. (V.) braziliensis*.

**Key Words:** Cutaneous leishmaniasis, Cellular immunity, Cytokines, Flow cytometry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Caracterização das formas evolutivas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	17
<b>Figura 2</b> - Ciclo biológico de <i>Leishmania spp.</i> .....	18
<b>Figura 3</b> - Formas clínicas da LTA. ....	19
<b>Figura 4</b> - Distribuição mundial da leishmaniose cutânea. ....	20
<b>Figura 5</b> - Diagnóstico da LTA. ....	22
<b>Figura 6</b> - Diferenciação de células T auxiliares. ....	26
<b>Figura 7</b> - Esquema demonstrando a resposta imune na LTA.....	27
<b>Figura 8</b> - Células Th17 integradas à sua rede de citocinas. ....	29
<b>Quadro 1</b> - Marcações utilizadas no ensaio de imunofenotipagem através de citometria de fluxo. ....	37
<b>Figura 9</b> - Exemplo de gráfico de Dispersão frontal versus Dispersão lateral em PBMC com delimitação da população linfocitária. ....	38
<b>Figura 10</b> - Exemplo de gráfico de fluorescência SSCxFL1, utilizado para delimitação da população CD4 <sup>+</sup> e posterior análise da produção de citocinas por essa população celular. ....	39
<b>Figura 11</b> - Exemplo de gráfico FL2xFL4 para detecção da produção de citocinas por células CD4 <sup>+</sup> . ....	39
<b>Figura 12</b> - Análise quantitativa de citocinas de sobrenadante de cultura utilizado pelo <i>BD CBA Analyses Software</i> . ....	42
<b>Figura 13</b> - Produção de citocinas por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (A e B) e T CD8 <sup>+</sup> (C) de pacientes com LTA ativa nos tempos de 6, 24 e 120h após estímulo com mitógenos. ....	50
<b>Figura 14</b> - Produção de citocinas Th1 e Th2 por linfócitos T auxiliares (CD4 <sup>+</sup> ) e citotóxicos (CD8 <sup>+</sup> ) em pacientes com LTA antes do tratamento (PC) e controles (CT). ....	52
<b>Figura 15</b> - Produção de citocinas do perfil Th17 por linfócitos T auxiliares (CD4 <sup>+</sup> ) em pacientes com LTA antes do tratamento (PC) e controles (CT).....	53
<b>Figura 16</b> - Produção de citocinas por linfócitos T auxiliares (CD4 <sup>+</sup> ) e citotóxicos (CD8 <sup>+</sup> ) em controles (CT) e pacientes com lesão ativa única (LCL) e múltiplas lesões (LCD). ....	54

<b>Figura 17</b> - Produção de citocinas do perfil Th17 por linfócitos T auxiliares (CD4 <sup>+</sup> ) em controles (CT) e pacientes com lesão ativa única (LCL) e múltiplas lesões (LCD). .....	<b>55</b>
<b>Figura 18</b> - Associação entre os perfis Th17 x Th1, Th1 x Th2 e Th17 x Th2 em pacientes com LTA ativa.....	<b>56</b>
<b>Figura 19</b> - Concentração sérica de citocinas em pacientes com LTA ativa (AT), após o tratamento quimioterápico (PT), pacientes que apresentaram cura espontânea (CE) e controles (CT). .....	<b>57</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características do grupo de estudo. ....	<b>45</b>
<b>Tabela 2</b> - Diagnóstico laboratorial dos pacientes curados espontaneamente dos participantes do ensaio de dosagem sérica de citocinas. ....	<b>46</b>
<b>Tabela 3</b> - Diagnóstico laboratorial dos pacientes antes e após tratamento dos participantes do ensaio de dosagem sérica de citocinas. ....	<b>47</b>
<b>Tabela 4</b> - Diagnóstico laboratorial dos pacientes antes do tratamento participantes do ensaio de imunofenotipagem e do ensaio de dosagem sérica de citocinas. ....	<b>48</b>
<b>Tabela 5</b> - Comparação da média do percentual de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> em pacientes com LTA ativa (PC) e controles (CT). ....	<b>49</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(V.)	( <i>Viannia</i> )
APC	Alofocianina
CD	Cluster de diferenciação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Canal de leitura de fluorescência
FSC	Canal de dispersão frontal (Forward Scatter)
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
mRNA	RNA mensageiro
NK	Células exterminadoras naturais (natural-killer)
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
RNA	Ácido ribonucléico
SSC	Canal de dispersão lateral (Side Scatter)
T CD4+	Linfócito T CD4+
T CD8+	Linfócito T CD8+
Treg	Células T regulatórias
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$	Fator beta de crescimento e transformação
Th	Linfócito T auxiliar
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alpha
TNF- $\beta$	Fator de necrose tumoral beta

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Marco teórico conceitual .....</b>	<b>16</b>
2.1	Aspectos Gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana .....	16
2.2	Epidemiologia da LTA .....	20
2.3	Diagnóstico da LTA .....	21
2.4	Tratamento da LTA .....	23
2.5	Perspectivas de Controle .....	24
2.6	Resposta Imune na LTA .....	24
<b>3</b>	<b>Justificativa.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Pergunta Condutora .....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>Hipótese.....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>34</b>
6.1	Geral .....	34
6.2	Específicos.....	34
<b>7</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>35</b>
7.1	Tipo de estudo .....	35
7.2	Processo de seleção da população estudada .....	35
7.3	Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes .....	36
7.4	Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos pacientes selecionados.....	36
7.5	Imunofenotipagem celular através de citometria de fluxo .....	36
7.6	Análise dos dados obtidos através de citometria de fluxo.....	38

7.7 Dosagem de citocinas no soro de pacientes com LTA através de citometria de fluxo. ....	40
7.8 Aquisição e análise de dados do ensaio de dosagem sérica no citômetro de fluxo.....	41
7.9 Análise estatística .....	42
<b>8 Considerações éticas .....</b>	<b>43</b>
<b>9 Resultados.....</b>	<b>44</b>
9.1 Seleção de Pacientes.....	44
9.2 Percentual de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> em cultura de células de pacientes com LTA ativa.....	48
9.3 Padronização do tempo de cultura para análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas após estímulo com mitógenos.....	49
9.4 Avaliação da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23 por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> .....	51
9.5 Associação entre a produção de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 .....	55
9.6 Dosagem de citocinas no soro de pacientes com LTA através de citometria de fluxo .....	57
<b>10 Discussão .....</b>	<b>58</b>
<b>11 Conclusões.....</b>	<b>67</b>
<b>Referências .....</b>	<b>68</b>
<b>Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Grupo Paciente.....</b>	<b>75</b>
<b>Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Grupo Paciente Menor de 18 anos .....</b>	<b>77</b>
<b>Apêndice C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Grupo Controle.....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo A – Parecer do Comitê de Ética da Instituição .....</b>	<b>81</b>

## 1 Introdução

---

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença emergente e re-emergente, havendo um aumento da sua incidência nas duas últimas décadas (BASANO; CAMARGO, 2004; GOTO; LINDOSO, 2010). Estima-se que as leishmanioses em geral apresentem uma prevalência de 12 milhões de casos no mundo, sendo que 350 milhões de pessoas estão ameaçadas de contrair a doença. As leishmanioses ocorrem em 88 países, sendo 72 destes países em desenvolvimento. Noventa por cento dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru e 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (DESJEUX, 2004). Nas Américas, a leishmaniose tegumentar distribui-se do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (NEVES, 2005). Em Pernambuco, é uma doença endêmica, e a Zona da Mata concentra 60% dos casos (BRANDÃO-FILHO et al, 1994; BRITO et al., 2009).

As formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA) dependem da espécie do parasita, do vetor, além das características epidemiológicas, constituição genética e condição imunológica do hospedeiro (ROGERS *et al.*, 2002). A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é considerada uma das espécies mais importantes para a saúde pública, não só por ser responsável pela maioria dos casos de LTA no país, como também pela sua capacidade de causar desde uma infecção cutânea localizada até graves lesões mucocutâneas mutilantes (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Essa espécie, transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, é o principal agente identificado até o momento em Pernambuco (ANDRADE *et al.*, 2005; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 2009).

Sabe-se que as infecções por *Leishmania* levam a uma ativação da resposta imunológica no hospedeiro. Há uma expansão de vários tipos de células, caracterizada sobretudo por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (HOLZMULLER; BRAS-GONÇALVES; LEMESRE, 2006; REIS *et al.*, 2006). Após o tratamento quimioterápico e a cura se observa uma diminuição proporcional dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, com um aumento de T CD8<sup>+</sup> sendo esse balanço implicado no processo de resistência a LTA com produção de um padrão de resposta imunológica Th1 (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; COUTINHO *et al.*, 2002, DA-CRUZ *et al.*, 2002; GOLLOB *et al.*, 2008).

Estudos têm mostrado que uma boa resposta Th1 é necessária, auxiliando na proteção ao parasita. Se a resposta for do tipo Th1, citocinas como Interleucina(IL)-2, Interferon(IFN)-



gama, Fator de necrose tumoral (TNF)-alfa e IL-12 serão produzidas, promovendo ativação de macrófagos e destruição dos parasitas. Por outro lado, se a resposta for do tipo Th2 serão produzidos IL-4 e IL-10. Estas citocinas provocarão uma baixa ativação macrofágica e, conseqüentemente, as formas clínicas aparecerão. A *Leishmania* é capaz de direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela persistência da infecção (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; REIS *et al.*, 2006).

Estudos recentes têm evidenciado o novo subtipo celular conhecido como Th17, relacionado com a produção de IL-17, a princípio envolvida com a patogênese de doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes (BETELLI *et al.*, 2008; OUKKA, 2007; SCHMIDT-WEBER; AKDIS; AKDIS, 2007; STOCKINGER; VELDHOEN, 2007). IL-17 aumenta a produção de múltiplos mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e NOS2. Diversos estudos apontam que a resposta Th17 esteja presente na resposta inicial a diversos patógenos (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2009).

Além de IL-17, também IL-22 tem sido descrita em doenças autoimunes, infecções extracelulares e na alergia (EYERICH *et al.*, 2010; SCHNYDER; LIMA; SCHNYDER-CANDRIAN, 2010). Embora poucos aspectos sejam conhecidos sobre o papel desta citocina em infecções por *Leishmania*, Pitta *et al.* (2009) observaram uma alta concentração de IL-22 e também de IL-17 em pacientes resistentes ao kala azar causado por *L. donovani*, e sugerem que elas tenham um papel complementar àquele exercido pelas citocinas Th1 na proteção do indivíduo contra a doença.

A resposta Th17 surge provavelmente como uma resposta inicial a um grande número de patógenos que não são bem resolvidos pela resposta do tipo Th1-Th2 e que requerem inflamação tecidual mais exacerbada para serem eliminados. As células Th17 podem preencher a lacuna entre a resposta imune inata e adaptativa, e atrair outros tipos de células para o sítio de infecção em estágios mais tardios do processo inflamatório (BETELLI *et al.* 2008).

Atualmente as pesquisas buscam identificar marcadores imunológicos que permitam compreender os processos que levam a formação da lesão na LTA, como também os mecanismos responsáveis pela resistência à doença. Sendo assim, o presente trabalho buscou compreender a associação entre produção de citocinas na resposta imune celular de pacientes com leishmaniose tegumentar americana ativa e após a cura clínica, e pacientes curados espontaneamente, especialmente relacionando a resposta imune dos perfis Th1, Th2 e Th17, visto que estudo semelhante ainda não foi realizado no estado de Pernambuco.

## 2 Marco teórico conceitual

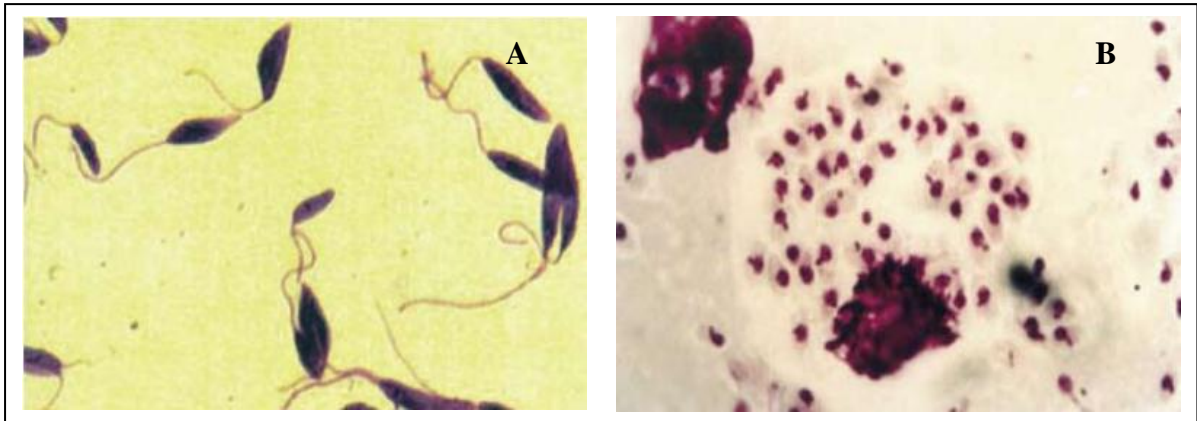
---

### 2.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença de caráter antroponótico que tem como agente etiológico protozoários parasitas intracelulares pertencentes à família Trypanosomatidae, de diferentes espécies do gênero *Leishmania*. No Brasil, a espécie de maior incidência é *Leishmania (Viannia) braziliensis* (*L. (V.) braziliensis*) (NEVES, 2005).

Existem sete espécies destes parasitas associados à leishmaniose tegumentar no Brasil até o momento: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) lindenberg* (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Em Pernambuco, foram isoladas cepas de *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (Viannia) shawi* (BRITO *et al.*, 2009).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam dois estágios em seu ciclo de vida: a forma promastigota móvel, flagelada que habita o meio extracelular do trato alimentar do vetor flebotomíneo e a forma amastigota que vive no interior de células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro mamífero (Figura 1) (BRASIL, 2007).

**Figura 1** - Caracterização das formas evolutivas de *L. (V.) braziliensis*.

Fonte: Brasil (2007).

Nota: (A) Apresenta a forma promastigota do parasita em meio extracelular e (B) sua forma amastigota no interior de macrófagos.

Os vetores da LTA são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, a depender da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (BRASIL, 2007).

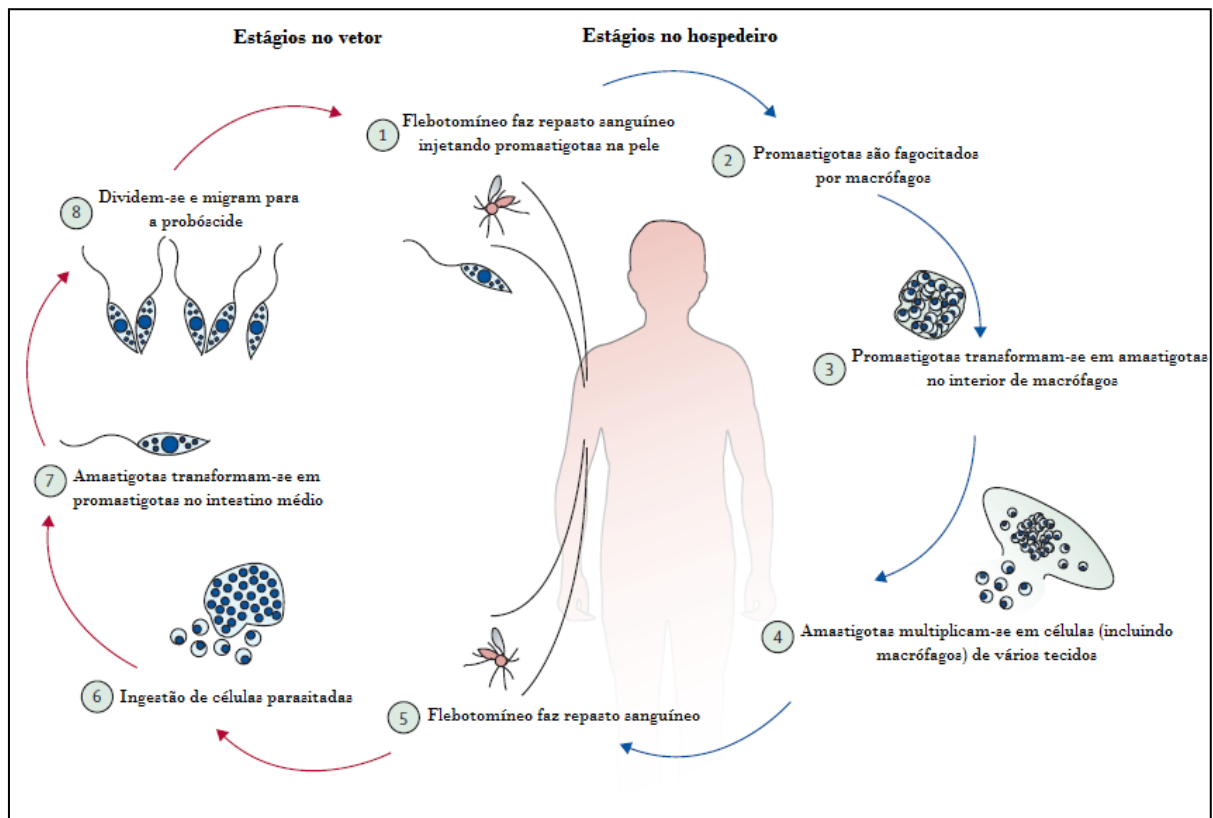
O ciclo evolutivo de *Leishmania* inicia-se quando o vetor faz o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. As formas amastigotas do parasita, estruturas arredondadas e ovaladas são encontradas em células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado. As mesmas se alojam nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos em que vivem, e reproduzem-se de forma assexuada por divisão binária até romperem a célula, disseminando-se pelas vias hematogênica e linfática (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003). No momento do repasto sanguíneo a fêmea do flebotomíneo ingere macrófagos infectados com as formas amastigotas e em seu trato digestivo estes se rompem liberando o parasita. Este se aloja em partes do intestino, transformando-se na forma promastigota, que é alongada e apresenta um longo flagelo livre (Figura 2) (NEVES, 2005).

As espécies do gênero *Leishmania* estão divididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. Os promastigotas pertencentes ao subgênero *Viannia* dirigem-se ao intestino, onde colonizam a seção peripilária, enquanto os pertencentes ao subgênero *Leishmania* aderem à seção suprapilária. Nesses locais ocorre diferenciação das formas promastigotas em paramastigotas, que permanecem aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal através de hemidesmossomas, onde ainda se dividem. Novamente ocorre transformação em promastigotas que migram através do estômago em direção à faringe do inseto. A

metaciclologênese ocorre durante a migração no trato digestivo do vetor, em que as células atingem um estado infectivo (BASANO; CAMARGO, 2004; NEVES, 2005).

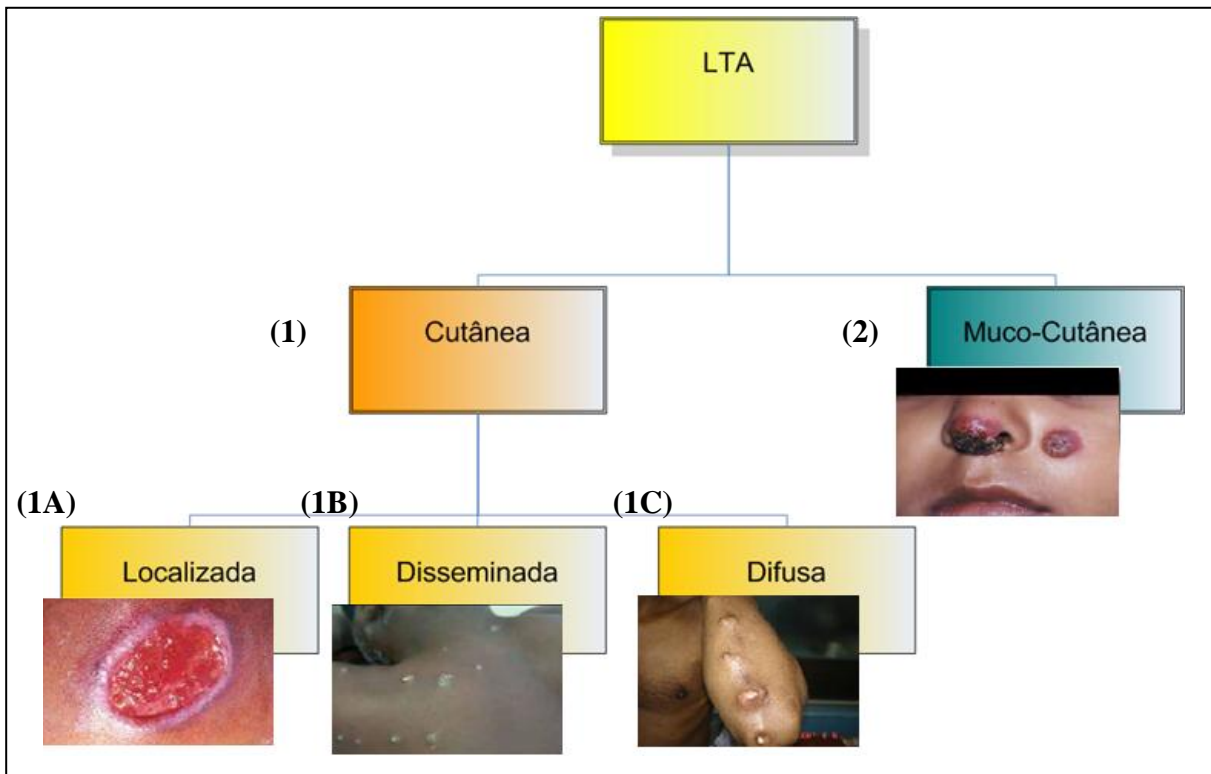
Durante o repasto sanguíneo do vetor ocorre a transmissão do parasita. Formas promastigotas são inoculadas através da picada e, após um período de quatro a oito horas, são interiorizadas pelos macrófagos do hospedeiro, diferenciando-se novamente em formas amastigotas. Estas se multiplicam e podem ser novamente ingeridas pelo vetor, completando o ciclo (Figura 2) (NEVES, 2005; REITHINGER *et al.*, 2007).

**Figura 2** - Ciclo biológico de *Leishmania spp.*



Fonte: Adaptado de Reithinger *et al.* (2007).

As manifestações clínicas são variáveis e dependem de características do parasita, do vetor, e do hospedeiro vertebrado, incluindo a sua constituição genética e estado imunológico (MARZOCHI, 1992; GRIMALDI; TESH, 1993; REIS *et al.*, 2009). A infecção pode ser assintomática ou pode apresentar um espectro de manifestações clínicas que variam de lesões cutâneas localizadas (Figura 3, 1A). As lesões localizadas podem evoluir para cura espontânea, ou para a forma disseminada (Figura 3, 1B), difusa (Figura 3, 1C) ou até mesmo para a forma mais severa com acometimento de mucosas (figura 3, 2) (DESJEUX, 2004).

**Figura 3** - Formas clínicas da LTA.

Fonte: Adaptado de Gontijo e Carvalho (2003).

Nota: (1A) Corresponde à forma cutânea localizada (lesão clássica em moldura), (1B) à forma cutânea disseminada, (1C) à forma difusa e (2) à forma mucosa.

A leishmaniose cutânea caracteriza-se pela formação de lesões ulcerosas exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor. A lesão primária é geralmente única, embora múltiplas picadas do mosquito possam levar a lesões múltiplas disseminadas (Figura 3, 1B) (DESJEUX, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003). A densidade de parasitas é alta nas fases iniciais da infecção e tende a diminuir nas úlceras crônicas. Sua forma recidivante é mais severa, sendo duradoura, destrutiva, desfigurante e difícil de tratar (DESJEUX, 2004; NEVES, 2005).

A leishmaniose cutâneo-difusa (Figura 3, 1C) é uma variação da forma cutânea e geralmente está associada a pacientes com imunidade celular deficiente. Sua severidade está relacionada à semelhança de suas lesões nodulares e infiltrações cutâneas pronunciadas à hanseníase virchowiana (DESJEUX, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Nessa forma, as lesões não se curam espontaneamente e o indivíduo está sujeito a recidivas após o tratamento (DESJEUX, 2004).

A leishmaniose cutâneo-mucosa, também conhecida como espúndia, tem como principal agente etiológico a *Leishmania braziliensis* (DESJEUX, 2004; GONTIJO;

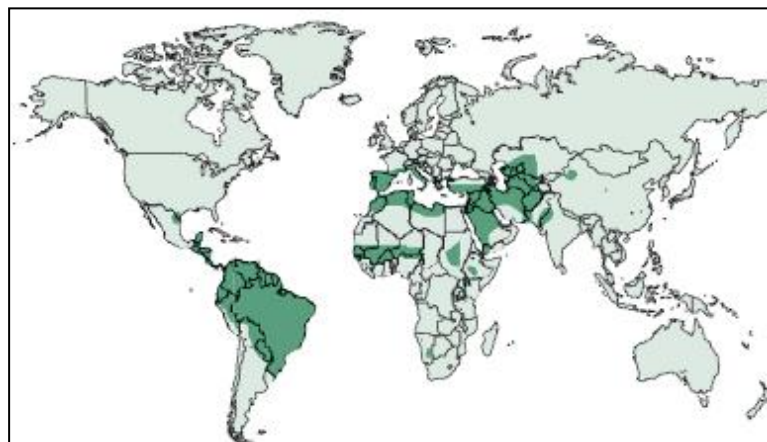
CARVALHO, 2003; NEVES, 2005). O curso da infecção nas fases iniciais ocorre como a forma cutânea. Porém, meses após a lesão inicial primária aparecem lesões secundárias que acometem mucosas e cartilagens, podendo ocorrer por extensão direta de uma lesão primária ou através da disseminação hematogênica (NEVES, 2005). Nessa forma, as regiões mais frequentemente acometidas são o nariz, a faringe, a boca e a laringe, muitas vezes por lesões desfigurantes e com mutilação da face (DESJEUX, 2004; NEVES, 2005).

## 2.2 Epidemiologia da LTA

A LTA é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o século I d.C. (BASANO; CAMARGO, 2004). É considerada uma doença em expansão, com uma incidência anual de 40.000 casos, o que caracteriza um problema de saúde pública (DESJEUX, 2004).

As leishmanioses apresentam uma prevalência de aproximadamente 12 milhões de casos no mundo, enquanto 350 milhões de pessoas estão ameaçadas de contrair a doença. A leishmaniose ocorre em 88 países: 72 são países em desenvolvimento e 13 destes estão entre os menos desenvolvidos. Noventa por cento dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru e 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (Figura 4) (BRASIL, 2007; DESJEUX, 2004).

**Figura 4** - Distribuição mundial da leishmaniose cutânea.



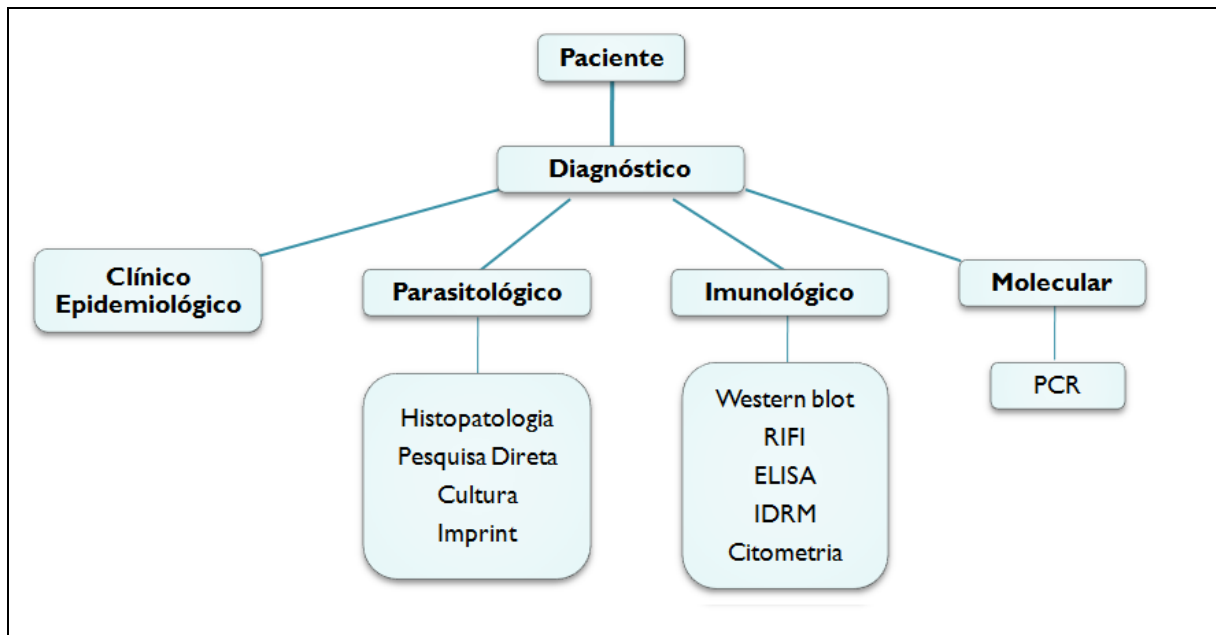
Fonte: Reithinger *et al.* (2007).

No Brasil, a LTA tem sido assinalada em todos os estados e, nos últimos 20 anos têm sido observados surtos epidêmicos sob diferentes perfis epidemiológicos (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000). Em Pernambuco, incide em todas as regiões, predominantemente na Zona da Mata, com mais de 60% dos casos, sendo a quase totalidade da forma cutânea localizada (ANDRADE *et al.*, 2005; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994).

### **2.3 Diagnóstico da LTA**

A LTA apresenta um diagnóstico difícil devido às suas lesões se assemelharem às de outras doenças, como tuberculose cutânea, hanseníase virchowiana, infecções micóticas, úlcera tropical, sífilis, neoplasmas, entre outras (GONTIJO; CARVALHO, 2003; NEVES, 2005).

Devido às diversas manifestações clínicas, seu diagnóstico abrange aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (Figura 5) (GONTIJO; CARVALHO, 2003; NEVES, 2005). Associado à anamnese, o diagnóstico clínico pode ser feito com base na característica da lesão que o paciente apresenta, além da avaliação dos dados epidemiológicos da doença. O diagnóstico clínico-epidemiológico pode ser complementado pela intradermoreação de Montenegro positiva e, eventualmente, pela resposta terapêutica. Todavia, os métodos laboratoriais são fundamentais para o diagnóstico diferencial de outras doenças (BRASIL, 2007; NEVES, 2005).

**Figura 5** - Diagnóstico da LTA.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os exames laboratoriais podem ser realizados através da pesquisa direta do parasita em material colhido de lesão por escarificação, punção aspirativa e/ou biópsia da borda, podendo ser feita impressão desta biópsia por aposição em lâmina de vidro. A partir daí, a pesquisa do parasita é feita através de esfregaços corados por Giemsa, exame histopatológico, cultura *in vitro* e inóculo em animais de laboratório (BASANO; CAMARGO, 2004; NEVES, 2005).

A intradermoreação de Montenegro é uma forma indireta e muito utilizada de se realizar o diagnóstico. A mensuração da resposta imune celular é feita entre 48 a 72 horas após injeção intradérmica de antígenos do parasita. São consideradas positivas reações com área de endurecimento maior que 5mm (BASANO; CAMARGO, 2004).

A citometria de fluxo apresenta boa sensibilidade (86%) e especificidade (77%) e tem sido pesquisada como mais uma alternativa de ferramenta diagnóstica para a LTA. Através da citometria de fluxo, Oliveira *et al.* (2013) mostraram a detecção de anticorpos contra *Leishmania* por um período de até 5 anos após a cura clínica. A citometria de fluxo tem sido comparada à imunofluorescência indireta (que apresenta sensibilidade e especificidade de 71% e 69%, respectivamente) (OLIVEIRA, 2011).

Outros métodos imunológicos incluem o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o Western Blot (BASANO; CAMARGO, 2004, DESJEUX, 2004; NEVES, 2005). Métodos



moleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR), de alta sensibilidade, apresentam-se como outra opção para o diagnóstico laboratorial (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

## 2.4 Tratamento da LTA

Para todas as formas clínicas da LTA, o tratamento de primeira escolha é feito através de quimioterapia, utilizando-se antimoniais pentavalentes como o antimoniato de meglumine ou antimoniato de N-metilglucamine (Glucantime®) ou estibogluconato de sódio (Pentostan®), este último não comercializado no Brasil. Os antimoniais são drogas consideradas leishmanicidas por interferirem na bioenergética das formas amastigotas, inibindo tanto a glicólise como a oxidação de ácidos graxos (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003). O tratamento de segunda escolha é realizado nos casos não responsivos ao tratamento convencional ou na sua impossibilidade, através da utilização de drogas como Anfotericina B e Pentamidina (BASANO; CAMARGO, 2004; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose do antimonial seja calculada em  $\text{mg/Sb}^{\text{V}}/\text{Kg}/\text{dia}$  ( $\text{Sb}^{\text{V}}$  = antimônio pentavalente). Nas formas cutâneas localizadas e disseminadas sugere-se  $15\text{mg/Sb}^{\text{V}}/\text{Kg}/\text{dia}$  tanto para adultos quanto para crianças. O tratamento é realizado durante 20 dias seguidos e aplicado via intramuscular ou endovenosa. Se não houver cicatrização completa três meses após o término do tratamento, o esquema deve ser repetido, prolongando-se para 30 dias. Persistindo o insucesso terapêutico, devem ser utilizadas drogas de segunda escolha. Na forma difusa a dose é de  $20\text{mg/Sb}^{\text{V}}/\text{Kg}/\text{dia}$ , durante 20 dias seguidos. Inicialmente pode-se observar relativa resposta terapêutica, porém são frequentes as múltiplas recidivas (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Os efeitos colaterais do tratamento com antimoniais incluem artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. Além disso, os antimoniais apresentam elevada hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade (BRASIL, 2007).

O critério de cura é clínico, sendo o paciente acompanhado por um ano após o término do tratamento (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000; GONTIJO; CARVALHO,

2003). Todavia, mesmo com o tratamento adequado, a ocorrência de recidivas e/ou comprometimento de mucosas é frequente. Pode ocorrer em 2% dos casos tratados e em aproximadamente 10% dos casos não tratados (BASANO; CAMARGO, 2004; CUNNINGHAM, 2002).

Existem ainda casos de pacientes que se curam espontaneamente, algumas vezes com uma evolução clínica inferior a três meses de infecção. Esses casos sugerem que esses pacientes desenvolvam uma resposta imune capaz de controlar a sua infecção por *Leishmania* (BRITO *et al.*, 2001).

## 2.5 Perspectivas de Controle

Há diferentes abordagens utilizadas para o controle da LTA. Dentre elas, ressalta-se a vigilância epidemiológica com notificação de casos e tratamento; medidas de atuação na cadeia de transmissão, impedindo a infecção de vetores, hospedeiros e reservatórios; medidas educativas, incluindo a utilização proteção individual, como mosquiteiros, telas finas nas janelas e portas, repelentes e roupas que protejam áreas expostas, e distanciamento das construções de matas. Outras abordagens incluem medidas administrativas como saneamento (evitando o acúmulo de lixo e de detritos que possam atrair roedores e pequenos mamíferos, que podem servir como reservatório). Melhorias das condições de habitação e capacitação de profissionais de saúde também são essenciais. O desenvolvimento de uma vacina eficiente e operacional seria uma medida definitiva e eficaz em termos de custos e prevenção (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007; DESJEUX, 2004; NEVES, 2005).

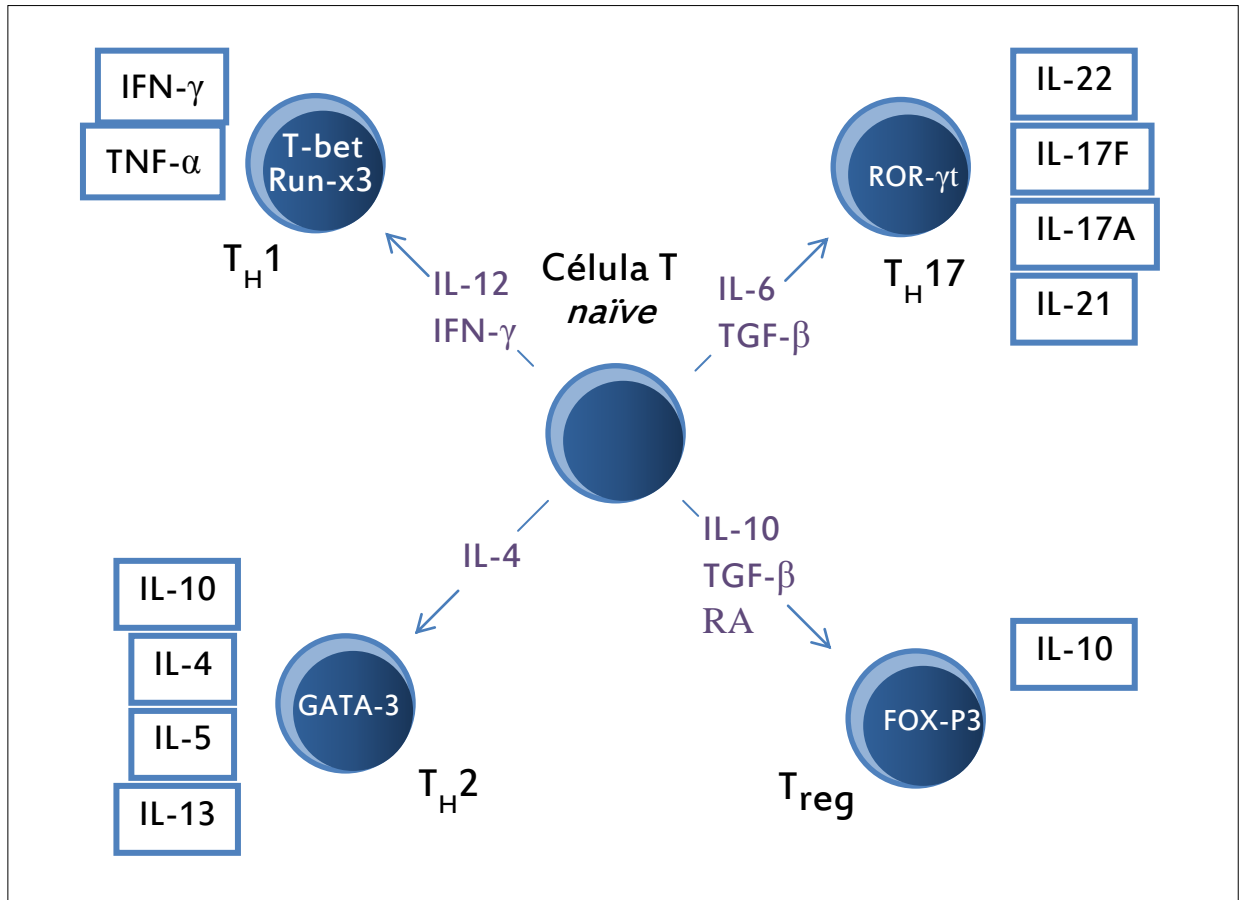
## 2.6 Resposta Imune na LTA

As infecções por *Leishmania* levam a uma ativação específica da resposta imunológica por parte do hospedeiro. Ao ser introduzido no indivíduo pela picada do vetor, o parasita interage com o sistema imune da pele do hospedeiro. A patogênese da leishmaniose parece depender da resposta imune mediada por células do mesmo, influenciando o desenvolvimento

da doença, seja pelo tipo de linfócitos T efetores envolvidos ou pelo perfil de citocinas secretadas (DA-CRUZ *et al.*, 2005).

A infecção experimental em camundongos tem sido utilizada nos últimos 30 anos para elucidar aspectos da relação parasita-hospedeiro na leishmaniose, como o controle genético de susceptibilidade e resistência, o papel da resposta imune mediada por células e a interação parasita-macrófago (REIS *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2007). Na leishmaniose cutânea, os estudos mais aprofundados da resposta imune adaptativa foram desenvolvidos em camundongos isogênicos infectados com *L. major*. Os estudos têm mostrado que a resposta imune mediada por células T desempenha um papel importante na evolução da infecção para a cura ou desenvolvimento de doença grave (MATTNER *et al.*, 1996; REITHINGER *et al.*, 2007; SCOTT; FARREL, 1998).

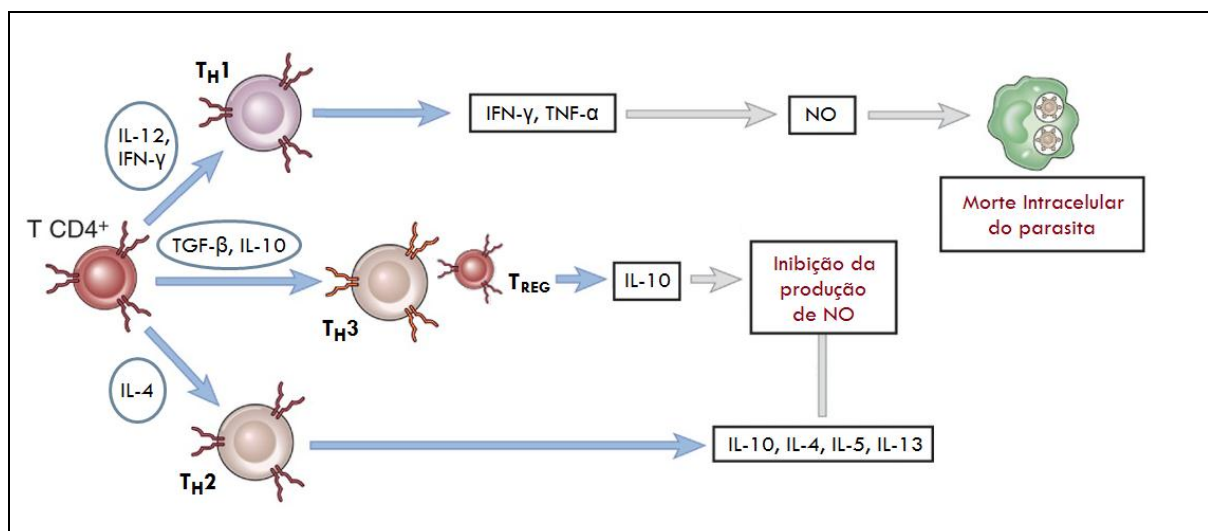
Estes estudos revelam que camundongos susceptíveis apresentam lesões cutâneas no sítio de inoculação do parasita, enquanto os camundongos resistentes parecem curar-se rapidamente. A resistência ao parasita é conferida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1, enquanto a susceptibilidade é conferida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do tipo Th2 (REIS *et al.*, 2006). Linfócitos T CD4<sup>+</sup> que apresentam o perfil Th1 têm sua diferenciação estimulada pelas citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  e produzem citocinas como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-2 e IL-12, e expressam o fator de transcrição T-bet. Células que apresentam o perfil Th2 são estimuladas por IL-4 e produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, expressando o fator de transcrição GATA-3 (Figura 6) (REIS *et al.*, 2009; SAKAGUCHI *et al.*, 2008). Além disso, IL-10 juntamente a TGF- $\beta$  e ácido retinóico atuam na ativação do perfil Th3, com diferenciação de células regulatórias (BELKAID, 2008; SAKAGUCHI *et al.*, 2008).

**Figura 6** - Diferenciação de células T auxiliares.

Fonte: Adaptado de Souza *et al.* (2013).

IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  atuam em sinergia induzindo a produção de óxido nítrico (NO), através da ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (GREEN *et al.*, 1994). O óxido nítrico inativa numerosas enzimas metabólicas do parasita a partir da formação de complexos ferro-ditrirosil-dithiolato. Na leishmaniose, os parasitas possuem a enzima superóxido dismutase e a inativação desta enzima diminuiria a habilidade do parasita de resistir ao ataque por intermediários de oxigênio reativo, resultando em sua morte intracelular (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; JAMES, 1995; LIEW *et al.*, 1990).

Por outro lado, a produção de NO pode ser regulada pelo fator  $\beta$  de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ ). Neste caso, o parasita estimula a produção desta citocina, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ . A indução de TNF- $\alpha$  ou TGF- $\beta$  depende da presença e quantidade de IFN- $\gamma$  no início da infecção (GREEN *et al.*, 1994; PINHEIRO *et al.*, 2005). Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> atuam como fonte produtora dessas citocinas envolvidas no processo de ativação de macrófagos (Figura 7) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; BRELAZ *et al.*, 2012).

**Figura 7** - Esquema demonstrando a resposta imune na LTA.

Fonte: Adaptado de Abbas, Lichtman e Pilai (2008) e Gollob *et al.* (2008).

Legenda: Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> do perfil Th1, estimuladas por IL-12 e IFN-γ, produzem IFN-γ e TNF-α, que levam à ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) estimulando os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), levando à morte intracelular do parasita. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> do perfil Th2, por sua vez, são estimuladas por IL-4 e produzem IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13, que inibem a produção de NO, dificultando o combate ao parasita. O perfil Th3, induzido por TGF-β e IL-10, estimula a produção de IL-10, que inibe a produção de NO, levando à resistência do parasita. Células T regulatórias atuam também na mediação da resposta por células efectoras.

Na prática, tem se mostrado que uma diferente ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> ocorre em diferentes formas da doença. Estudos mostram que na forma cutânea há prevalência na produção de IL-4 e IL-10, e também produção específica de IFN-γ e TNF-α por pacientes com lesões ativas (BRELAZ *et al.*, 2012). Além disso, na forma cutânea o mRNA para IL-2, IFN-γ e TNF-α dos pacientes é predominante em lesões localizadas, enquanto mRNA para IL-4 tem sido encontrado em lesões crônicas mucocutâneas (KHARAZMI *et al.*, 1999).

Em humanos, a resposta imune ainda não foi completamente elucidada. Porém, sabe-se que em todas as formas clínicas da doença a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, aceita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção está associada ao nível de expansão de células Th1 e Th2 (BRELAZ *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2006). Na forma cutânea localizada, há uma forte resposta de linfócitos T, com citocinas do tipo Th1, como IFN-γ e TNF-α. As lesões mucocutâneas, que constituem uma forma crônica associada à destruição de mucosas, caracterizam-se por uma mistura de resposta dos tipos Th1 e Th2. Pacientes com a forma difusa exibem uma resposta quase exclusivamente do tipo Th2, com produção de citocinas como IL-4 e IL-10 (COUTINHO *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2006). Em alguns trabalhos, foi descrito também o perfil Th3, induzido por TGF-β, que pode induzir

e manter a tolerância periférica através de células T regulatórias (BELKAID, 2007; SOUZA, 2009).

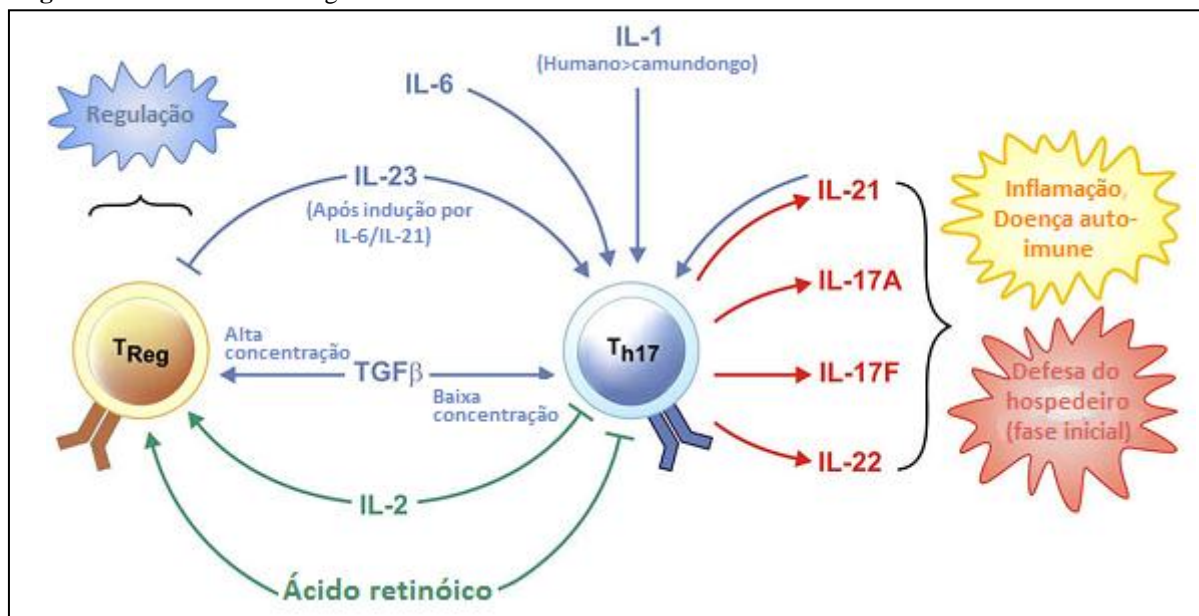
As células T regulatórias (Treg) que se acumulam no local da lesão, por sua vez, estão relacionadas à regulação das células efetoras locais. Células T regulatórias podem ser naturais ou induzidas. Citocinas como IL-2 e TGF- $\beta$  e substâncias como o ácido retinóico facilitam a diferenciação de células T *naïve* em Treg induzidas que expressam o fator de transcrição Foxp3 (KAUFMANN, KUCHROO, 2009; SAKAGUCHI *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm evidenciado também o subtipo celular conhecido como Th17, relacionado com a produção de IL-17. A princípio, IL-17 está envolvida com a patogênese de doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes (OUKKA, 2007; SCHMIDT-WEBER; AKDIS; AKDIS, 2007). IL-17 aumenta a produção de múltiplos mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e NOS2. Bacellar *et al.* (2009) demonstraram a produção de IL-17 durante a infecção por *L. (V.) braziliensis*, além de correlação direta entre esta citocina e TNF- $\alpha$ , indicando um possível envolvimento de IL-17 no progresso da LTA. No entanto, Pitta *et al.* (2009) relatam o papel benéfico desta citocina na leishmaniose visceral, encontrada aumentada em indivíduos saudáveis.

As células Th17 diferenciam-se a partir de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naïve* na presença de TGF- $\beta$  e IL-6 (DONG, 2008; KAUFMANN; KUCHROO, 2009). A citocina TGF- $\beta$  é também responsável pela indução de Foxp3, porém a citocina IL-6 atua na supressão da indução deste fator de transcrição. Deste modo, as duas citocinas em conjunto atuam na diferenciação de células Th17 (DONG, 2008; KAUFMANN; KUCHROO, 2009).

Além disso, outros fatores exibem uma relação recíproca entre células Treg Foxp3<sup>+</sup> e células Th17. A citocina IL-2 e o ácido retinóico são fatores de crescimento para Treg, enquanto inibem a diferenciação de células Th17. A citocina IL-1 também atua na amplificação da diferenciação de Th17, mas não é a principal condutora da diferenciação dessas células (KAUFMANN; KUCHROO, 2009; STOCKINGER; VELDHOEN, 2007) (Figura 8).

Durante a diferenciação, as células Th17 produzem IL-21 em abundância, que atua como fator de amplificação na indução de células Th17. IL-6 e IL-21 induzem a expressão de receptores de IL-23 na superfície celular de células Th17 em diferenciação e IL-23 é então capaz de atuar sobre essas células, estabilizando o seu fenótipo (KAUFMANN, KUCHROO; 2009) (Figura 8).

**Figura 8** - Células Th17 integradas à sua rede de citocinas.

Fonte: Adaptado de Kaufmann e Kuchroo (2009).

Legenda: As células Th17 mantêm uma relação estrita com as células T regulatórias em sua rede de citocinas. Ambas têm sua diferenciação estimulada por TGF- $\beta$ , porém as primeiras requerem uma alta concentração desta citocina para a sua diferenciação. Além disso, citocinas como IL-6 favorecem a diferenciação de células Th17, enquanto IL-2 e ácido retinóico favorecem a diferenciação de Tregs. IL-23 atua sobre células Th17 após a indução da diferenciação por IL-6 e/ou IL-21 estabelecendo o perfil. Células Th17 atuam através da produção de citocinas como IL-21, IL-17-A, IL-17F e IL-22 que possuem papel na inflamação, doenças autoimunes e atuam na resposta do hospedeiro na fase inicial da doença.

A maneira pela qual as células Th17 induzem inflamação tecidual ainda não está completamente elucidada. Estudos recentes sugerem que células produtoras de IL-17 se infiltram no sítio de inflamação recrutando células T efetoras pró-inflamatórias, incluindo células Th1, e células da imunidade inata, incluindo neutrófilos (KAUFMANN; KUCHROO, 2009).

A patogênese da LTA segue um padrão complexo de interações entre a resposta inata e adquirida do hospedeiro. Respostas inflamatórias medeiam a expressão da doença e podem resultar em infecção subclínica, lesões que se curam espontaneamente ou em lesões crônicas como as formas mucosa e recidivante (REITHINGER *et al.*, 2007).

A identificação de marcadores imunológicos e moleculares é importante na compreensão dos processos que levam à formação da lesão na LTA, assim como os mecanismos responsáveis pela resistência à doença. A diversidade de mecanismos imunes e citocinas relacionadas à resposta imunológica na LTA destacam a sua complexidade. Sendo assim, a abordagem apropriada de intervenções imunológicas na leishmaniose e outras doenças requer que sejam determinadas a fonte celular de citocinas e a contribuição de

populações celulares individuais para o ambiente geral dessas citocinas durante uma reposta imunológica (BOTTREL *et al.*, 2001).

O acetato de forbol miristato (PMA) é um polissacarídeo amplamente utilizado que atua através da indução da ativação policlonal de linfócitos. É utilizado como mitógeno em culturas celulares, ativando clones de células T com consequente estimulação da produção de citocinas (KIM *et al.*, 2000). A ionomicina, por sua vez, aumenta os níveis de cálcio intracelulares, e estimula a produção de citocinas (CHATILA *et al.*, 1989). Uma ferramenta que permite a identificação das populações celulares produtoras de citocinas é a citometria de fluxo, que permite a análise da resposta imune dos pacientes com LTA.

Para melhor compreender a LTA tem-se como grande desafio, portanto, a identificação de marcadores imunológicos (através do perfil imunofenotípico) e moleculares (expressão de citocinas) que permitam compreender os processos que levam a formação da lesão na LTA e mecanismos responsáveis pela resistência à doença. Procura-se através do presente estudo obter um maior entendimento desses marcadores em pacientes portadores de LTA ativa, verificando-se a evolução clínica dessa doença no estado de Pernambuco.



### 3 Justificativa

---

A leishmaniose tegumentar americana constitui um problema de saúde pública no Brasil, incluindo Pernambuco. Nesta doença tem se demonstrado a associação entre a produção de citocinas por células T e o curso da infecção.

É importante identificar marcadores imunológicos que permitam compreender os processos que levam a formação da lesão na LTA, assim como os mecanismos responsáveis pela resistência à doença. Sendo assim, o presente trabalho buscou compreender a associação entre produção de citocinas na resposta imune celular de pacientes com leishmaniose tegumentar americana ativa e após a cura clínica, e pacientes curados espontaneamente, especialmente relacionando a resposta imune dos perfis Th1, Th2 e Th17, visto que estudo semelhante ainda não foi realizado no estado de Pernambuco.

## **4 Pergunta Conduutora**

---

Qual o papel dos linfócitos T e produção de citocinas do perfil Th17, Th1 e Th2 na patogênese da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco?

## **5 Hipótese**

---

Os linfócitos T atuam na LTA através da produção de citocinas, de maneira que a resposta Th1 e a resposta Th17 contribuem para a proteção, enquanto a resposta Th2 favorece a progressão da doença.

## 6 Objetivos

---

### 6.1 Geral

Avaliar a produção das citocinas por linfócitos T do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana ativa frente ao estímulo *in vitro* com os mitógenos acetato de formol miristato (PMA) e ionomicina.

### 6.2 Específicos

- A) Caracterizar os pacientes desse estudo quanto aos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais;
- B) Verificar no sangue periférico dos pacientes com LTA ativa a proporção dos linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, frente ao estímulo *in vitro* com os mitógenos PMA e ionomicina;
- C) Estabelecer através da citometria de fluxo o melhor tempo para produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4, IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23, após estímulo *in vitro* do sangue periférico com mitógenos PMA e ionomicina;
- D) Identificar no sangue periférico dos pacientes com LTA ativa as populações celulares (linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>) responsáveis pela produção das citocinas citoplasmáticas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4, IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23, frente ao estímulo *in vitro* com os mitógenos PMA e ionomicina;
- E) Identificar a concentração sérica das citocinas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 de pacientes com LTA ativa e após a cura clínica e pacientes com cura espontânea;
- F) Associar os perfis fenotípicos celulares Th17, Th1 e Th2 observados com a progressão da doença nos pacientes avaliados.

## **7 Materiais e Métodos**

---

### **7.1 Tipo de estudo**

O estudo foi do tipo corte transversal com grupo de comparação. Estudos longitudinais são aqueles cujo objetivo é estudar o efeito de um ou mais fatores. Nestes estudos os dados estudados são coletados em dois momentos, no ponto inicial da exposição (o encontrado) e em um momento posterior. Foram realizadas comparações entre um grupo de participantes sujeitos a tratamento para LTA, outro grupo de participantes que obtiveram cura espontânea da doença e outro formado por sujeitos sem história prévia de LTA, denominado controle. Os participantes do estudo foram escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL; ALMEIDA-FILHO, 2003).

### **7.2 Processo de seleção da população estudada**

Para os ensaios de identificação de populações celulares produtoras de citocinas através da citometria de fluxo, foram selecionados pacientes portadores de lesões ativas (n=7) provenientes do município de Vitória de Santo Antão. Os mesmos receberam atendimento no posto de saúde do Município, foram esclarecidos acerca do objetivo do estudo e receberam tratamento independentemente de sua participação ou não no estudo. O grupo controle (n=10) foi constituído por indivíduos saudáveis, residentes em área não endêmica e que não receberam transfusão sanguínea. Para os ensaios de dosagem sérica de citocinas através de citometria de fluxo foram selecionados pacientes provenientes dos municípios de Moreno, Amaraji, Chã de Alegria, Araçoiaba e Jaboatão dos Guararapes, em Pernambuco. Foram selecionados pacientes portadores de lesão ativa (n=22), após o tratamento com Glucantime® (n=13), pacientes que apresentaram cura espontânea (n=8) e um grupo controle constituído por indivíduos saudáveis (n=14), sob as mesmas condições anteriormente citadas. Os procedimentos para coleta de sangue só foram realizados após todos os indivíduos concordarem em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndices A, B e C).

### **7.3 Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes**

Além da avaliação clínica e epidemiológica, os pacientes foram submetidos a alguns procedimentos laboratoriais para confirmação da doença. Os exames incluíram a) Teste de intradermoreação de Montenegro (IDRM); b) imunofluorescência indireta (IFI); c) ensaio imunoenzimático (ELISA) e d) citometria de fluxo. Os exames laboratoriais foram realizados em parceria com o Serviço de Referência em Leishmaniose do CPqAM-FIOCRUZ e com o Instituto Nacional de Saúde e Pesquisa Médica da França (INSERM).

### **7.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos pacientes selecionados**

Quarenta mililitros (40ml) de sangue foram coletados, utilizando-se o sistema a vácuo. O sangue foi diluído em PBS pH 7,2 na proporção 2:1 e transferido para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque (GE Healthcare), também na proporção 2:1. Após centrifugação, a 400 x g por 30 minutos a 20°C, a camada de PBMC obtida entre a mistura de Ficoll-Hypaque e o plasma foi removida, depositada em novos tubos cônicos e lavada com 20 ml de PBS. Depois de nova centrifugação a 300 x g por 15 minutos a 20°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 10 ml de PBS (pH 7,2) e novamente centrifugado a 300 x g, durante o mesmo tempo e mesma temperatura. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento composto de PBMC foi ressuscitado em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab). Uma alíquota da suspensão celular foi então removida, diluída 1:20 em azul de Trypan (Sigma) e quantificada em câmara de Neubauer. Foi feito o ajuste celular para o ensaio (viabilidade superior a 98%).

### **7.5 Imunofenotipagem celular através de citometria de fluxo**

Para a determinação das populações responsáveis pela produção de citocinas intracelulares, células mononucleares do sangue periférico foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (SBF) por tempo variável (6, 24 e 120 horas), em estufa de CO<sub>2</sub> com 5% de umidade à 37°C. O cultivo foi realizado na presença dos mitógenos

acetato de meristato forbol (PMA) (25 ng/ml) e ionomicina (1 µg/ml). Brefeldina A (10 µg/ml) foi adicionada por 4 horas antes do término da cultura para assegurar a retenção das citocinas no interior celular. Após a incubação, adicionou-se diretamente às culturas EDTA (ácido etilenodiaminotetraético) 20 mM, durante 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram então lavadas em solução salina contendo 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) e 0,1% de azida sódica (solução denominada de PBS-W), centrifugadas (370 x g, 7 minutos), transferidas para tubos de poliestireno. Em seguida, foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente, com anticorpos monoclonais de superfície (anti -CD3, -CD4 e -CD8). Após esse período, as células foram fixadas com solução salina contendo 1% de paraformaldeído por 10 minutos. Procedeu-se a lavagem por centrifugação (370 x g, 7 minutos) com PBS-W e permeabilização com PBS contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina (solução denominada de PBS-P). Logo em seguida, foram novamente lavadas com PBS-W e centrifugadas (400 x g, 5 minutos). As células foram então incubadas com anticorpos intracitoplasmáticos (anti -IFN- $\gamma$ , -TNF- $\alpha$ , -IL-10, -IL-17, -IL-21, -IL-22 e -IL-23) por 30 minutos. Após incubação, as células foram lavadas com PBS-W e centrifugadas (400 x g, 5 minutos). Posteriormente, adicionou-se solução fixadora composta por salina contendo 1% de paraformaldeído. As diferentes combinações de anticorpos utilizadas em cada tubo na citometria de fluxo estão descritas no quadro 1. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur e identificadas através do software “Cell Quest Pro” interligado ao citômetro.

**Quadro 1** - Marcações utilizadas no ensaio de imunofenotipagem através de citometria de fluxo

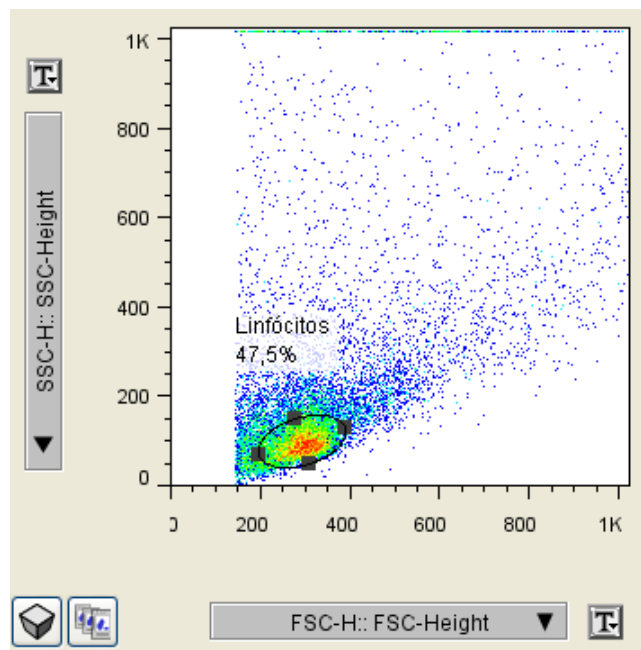
	FITC	PE	PECy7	APC/AF647
Th17	CD4	IL-17	CD3	IL-22
	CD4	IL-21	CD3	IL-22
	CD4	IL-23	CD3	IL-17
	CD4	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-17
Th1xTh2	CD8	IL-10	IFN- $\gamma$	CD4
	CD8	TNF- $\alpha$	IL-4	CD4

Fonte: Elaborado pela autora.

## 7.6 Análise dos dados obtidos através de citometria de fluxo

A análise dos eventos obtidos através de citometria foi feita utilizando o software Flowjo. A população linfocitária foi selecionada no gráfico de Dispersão frontal (FSC) versus Dispersão lateral (SSC) (Figura 9). A partir dessa região, foi feito um gráfico relacionando SSCxFL1 e a seleção da população CD4<sup>+</sup> para análise da produção de citocinas (Figura 10). A partir dessa população, foi verificada a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-21, IL-22, IL-23. A produção simultânea para o perfil Th17 foi observada com as combinações IL-17/IFN- $\gamma$ , IL-17/IL-22 e IL-21/IL-22. Para verificar a produção simultânea nos perfis Th1 e Th2 foram utilizadas as combinações IL-10/IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ /IL-4 (Figura 11).

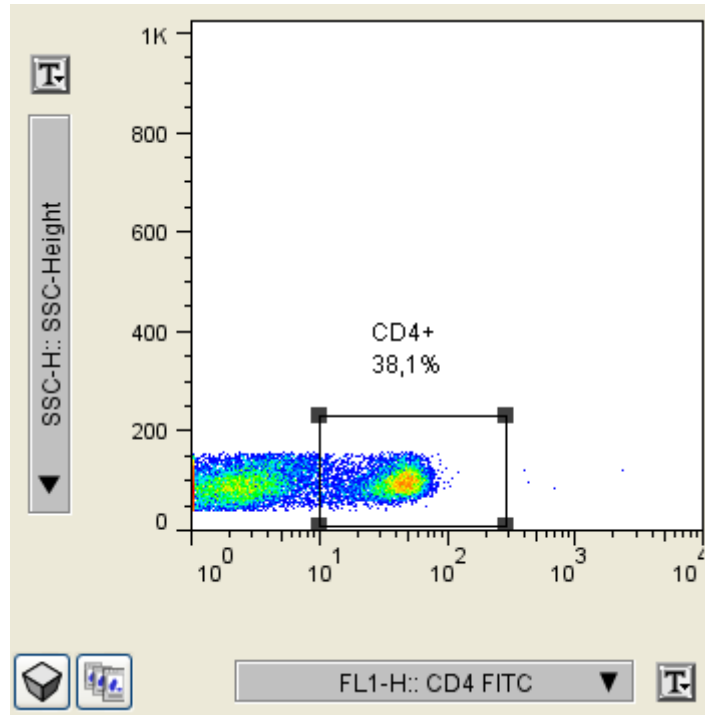
**Figura 9** - Exemplo de gráfico de Dispersão frontal versus Dispersão lateral em PBMC com delimitação da população linfocitária.



Fonte: Elaborado pela autora.

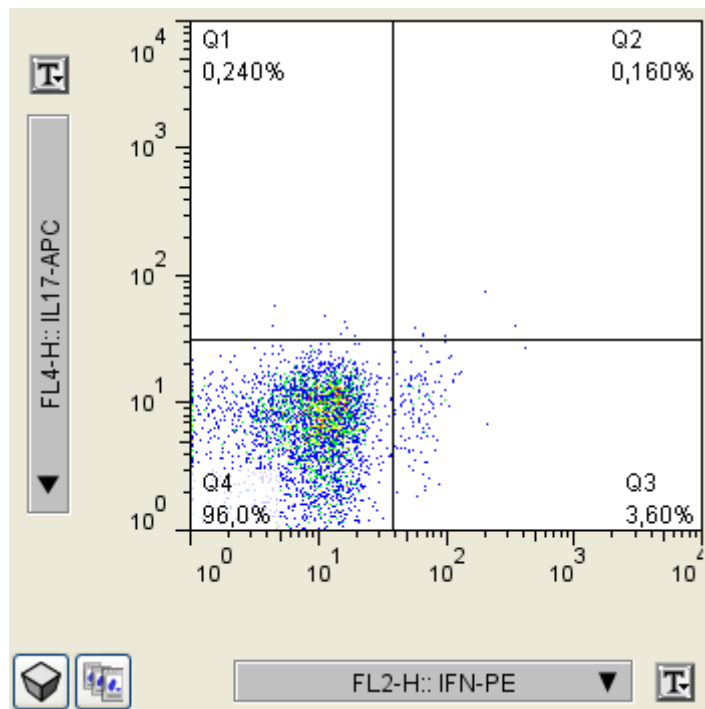


**Figura 10** - Exemplo de gráfico de fluorescência SSCxFL1, utilizado para delimitação da população CD4<sup>+</sup> e posterior análise da produção de citocinas por essa população celular.



Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 11** - Exemplo de gráfico FL2xFL4 para detecção da produção de citocinas por células CD4<sup>+</sup>.



Fonte: Elaborado pela autora.

### **7.7 Dosagem de citocinas no soro de pacientes com LTA através de citometria de fluxo**

A partir dos soros obtidos, os níveis plasmáticos de citocinas foram quantificados, utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) da Becton Dickinson-BD. Esse sistema emprega uma mistura de seis esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas, e são detectadas no canal FL-3. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio, empregando-se pequenos volumes de amostra.

A dosagem sérica das citocinas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 foi realizada em amostras de 22 pacientes antes do tratamento, 13 pacientes após o tratamento, 8 pacientes que apresentaram cura espontânea e 14 controles.

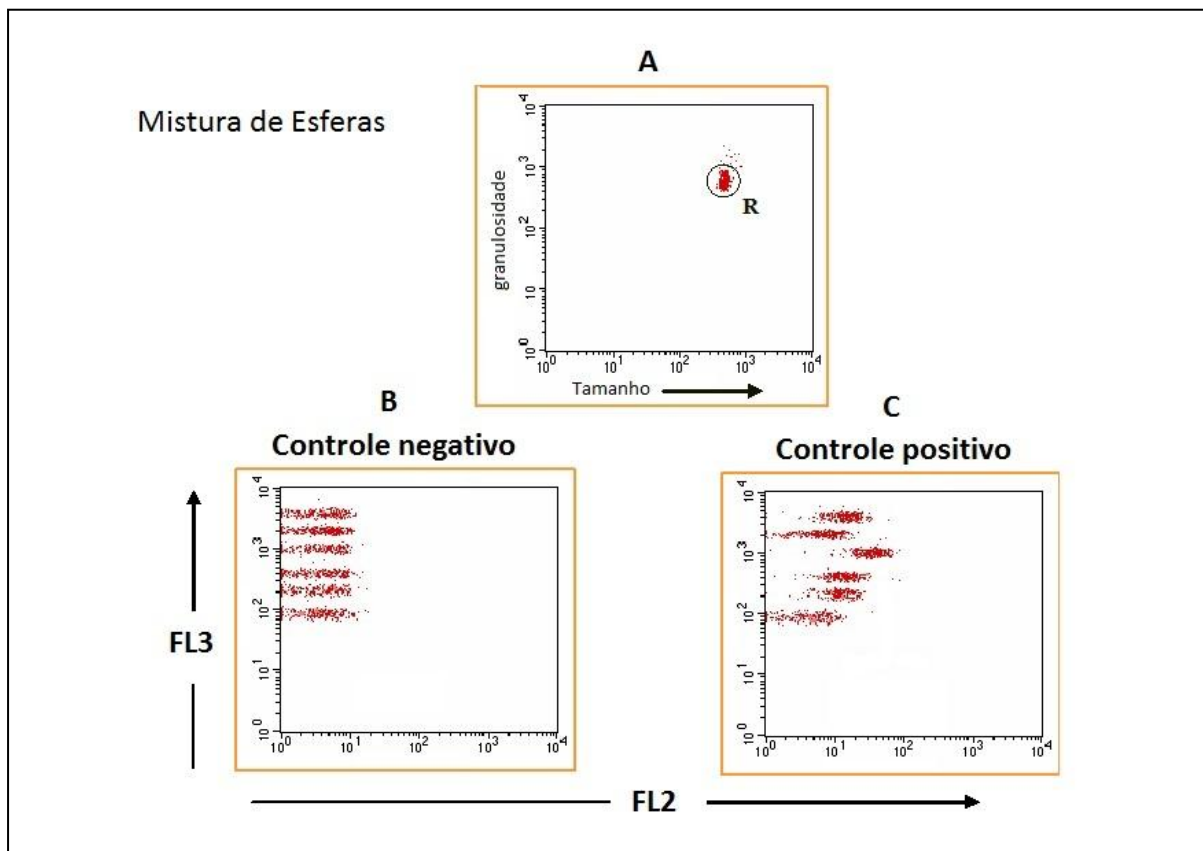
Inicialmente as amostras de soro de pacientes mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  foram descongeladas e centrifugadas a  $500 \times g$  por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo. Alíquotas de  $25\mu\text{L}$  do soro teste com diluente G, alíquotas de  $25\mu\text{L}$  dos padrões de citocinas, submetidos a diluição seriada com diluente G (reagente presente no kit CBA) (“Top Standart”) e  $25\mu\text{L}$  de diluente G apenas (Controle Negativo), foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon no 2052). Em seguida, a cada tubo foi adicionado  $15\mu\text{L}$  da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 (Human Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit) com subsequente incubação por 90 minutos em TA, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com  $500\mu\text{L}$  da solução F (“Wash buffer”, reagente presente no kit CBA), centrifugadas a  $600 \times g$ , por 7 minutos a  $18^{\circ}\text{C}$  e, o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram então re-incubadas na presença de  $20\mu\text{L}$  do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas (ou anti-quimiocinas) humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) por 90 minutos, T.A., ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com  $500\mu\text{L}$  da solução F, centrifugadas a  $600 \times g$ , por 7 minutos a  $18^{\circ}\text{C}$  e, o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em  $250 \mu\text{L}$  de reagente F e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo.

## 7.8 Aquisição e análise de dados do ensaio de dosagem sérica no citômetro de fluxo

Antes de proceder à aquisição dos dados das amostras, o aparelho foi ajustado, utilizando-se o BD FACSComp Software e o BD Calibrate Beads. O objetivo do ajuste do aparelho consistiu em definir os parâmetros de tamanho e granulosidade adequados para o posicionamento das esferas de captura em gráficos de tamanho versus granulosidade (R1). Após a seleção das esferas, procedeu-se o ajuste da intensidade da FL3 para permitir a segregação das esferas policromáticas, apresentando diferentes intensidades de fluorescência, em histogramas unidimensionais. Para cada tubo processado foram adquiridos 1800 eventos dentro da região selecionada R1 (300 eventos por citocina testada).

A análise do perfil de citocinas no soro dos pacientes e controles foi feita segundo protocolo proposto pelo fabricante através da utilização do *BD CBA Analyses Software*, com auxílio do Microsoft Excel, modificado como descrito a seguir. O programa BD CBA Analysis Software faz a seleção automática da região das esferas de captura em gráficos de tamanho versus granulosidade. Em seguida, o programa separa as esferas em função da intensidade da FL3 e analisa o deslocamento das esferas em função da intensidade da fluorescência 2 (FL2) em gráficos bidimensionais de FL2 versus FL3. A ligação da citocina presente na amostra de interesse à esfera de captura e a revelação da ligação através do uso de um coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas marcadas com ficoeritrina (PE) pode ser evidenciado através do deslocamento do conjunto de esferas para a região de maior intensidade de fluorescência em relação ao tubo controle negativo, sem soro humano (Figura 12). Os valores correspondentes à intensidade média de fluorescência FL2 na escala logarítmica são utilizados como a unidade de análise semi-quantitativa para cada citocina analisada.

**Figura 12** - Análise quantitativa de citocinas de sobrenadante de cultura utilizado pelo *BD CBA Analyses Software*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Inicialmente, o programa promove a seleção automática da população de esferas de captura em gráficos de tamanho versus granulosidade (A). Em seguida, separa as esferas e analisa a intensidade de fluorescência correspondente ao complexo esfera-citocina-anticorpo PE (B e C).

## 7.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Prism 5.0, empregando testes não-paramétricos, tendo o suporte científico do Laboratório de Métodos quantitativos do CPqAM/FIOCRUZ. A análise foi feita utilizando-se os testes de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos e Kruskal-Wallis para comparação entre três ou mais grupos nos ensaios de imunofenotipagem. O teste de Wilcoxon foi utilizado para os resultados dos grupos utilizados na padronização dos tempos de cultura e no ensaio de dosagem de citocinas séricas. As associações foram feitas utilizando testes de regressão linear. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$  sendo considerado estatisticamente significativo).

## **8 Considerações éticas**

---

Os procedimentos para coleta de sangue foram realizados somente após o indivíduo concordar em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (Apêndices A, B e C). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Instituição (CEP/CPqAM n° 123/08, CAAE n° 0122.0.095.000-08, Anexo A).

## 9 Resultados

---

### 9.1 Seleção de Pacientes

Os pacientes do estudo foram selecionados de acordo com critérios que incluíram idade, sexo e localidade de origem, forma clínica, número de lesões, localização das lesões e tempo de evolução da doença.

Foram selecionados 36 pacientes (PC), obedecendo-se os critérios de inclusão e exclusão. Houve uma discreta predominância de homens (52,77% dos pacientes) e evolução média da doença de 10,79 semanas. Destes pacientes, 25 apresentavam lesão ativa (AT), 13 foram pacientes após a cura clínica (PT), inseridos ou não no grupo de pacientes com lesão ativa e 8 apresentaram cura espontânea (CE). Os pacientes com lesão ativa apresentaram idades entre 13 e 62 anos, com uma média de idade de  $33,24 \pm 14,17$  anos. A idade dos pacientes após o tratamento variou entre 18 e 52 anos, com média de  $31,92 \pm 11,38$  anos. Os pacientes curados espontaneamente apresentaram idades entre 14 e 69 anos, com média de  $38,13 \pm 19,60$  anos. O grupo controle (CT) foi representado por 19 indivíduos saudáveis de área não endêmica, sem histórico da doença e com idade entre 20 e 51 anos. A média de idade dos controles foi de  $29,16 \pm 10,25$  anos (Tabela 1).

Antes do tratamento, os pacientes apresentaram de 1 a 8 lesões ulceradas com bordas elevadas e fundo granulomatoso com área total aproximada variável entre 0,78 e 103,8 cm<sup>2</sup>. Um dos pacientes apresentou lesão do tipo eritematosa. A maior parte das lesões estava distribuída por áreas descobertas do corpo. Em relação ao número de lesões, a maioria dos pacientes apresentou 1 lesão (63,9%), nove apresentaram de 2 a 4 lesões (25%) e apenas dois apresentaram 7 a 8 lesões. O tempo de evolução da doença, contado desde o surgimento da lesão até a procura do paciente pelo serviço de saúde, variou de 2 semanas a 4 meses. Os pacientes foram tratados com Glucantime®, exceto os pacientes que se curaram espontaneamente. Após o tratamento, os pacientes que apresentaram cura até o momento da conclusão deste trabalho apresentaram cicatrização das lesões com cicatriz característica em formato de pergaminho. Os pacientes CE foram captados de 1 mês após o aparecimento da lesão até 2 anos após a cicatrização de suas lesões.

**Tabela 1** - Características do grupo de estudo.

Características	Grupo de Estudo			
	AT	PT	CE	CT
<b>Número</b>	25	13	8	19
<b>Idade (média)</b>	33,24±14,17	31,92±11,38	38,13±19,60	29,16±10,25
<b>Razão H/M*</b>	15/10	6/7	3/5	11/8
<b>Evolução média da doença/cicatriz em semanas</b>	6,783	-	26,75	-
<b>Número médio de lesões/cicatrizes</b>	1,739	-	1,5	-
<b>Tamanho médio das lesões/cicatrizes em cm<sup>2</sup></b>	27,80±22,11	-	34,08±36,07	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: \* Razão H/M: Razão Homem/Mulher

De acordo com aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, todos os pacientes do estudo tiveram o diagnóstico para LTA confirmado. O diagnóstico clínico-epidemiológico foi feito de acordo com a avaliação dos médicos dermatologistas do hospital Oswaldo Cruz no Recife, e do posto médico de Vitória de Santo Antão. O diagnóstico laboratorial foi feito em parceria com o Serviço de Referência em Leishmaniose do CPqAM/FIOCRUZ e com o Instituto Nacional de Saúde e Pesquisa Médica da França (INSERM). Todos os pacientes apresentaram resultados positivos em pelo menos dois exames laboratoriais realizados, além do diagnóstico clínico confirmado (Tabelas 2, 3 e 4).

A intradermoreação de Montenegro (IDRM) foi positiva em todos os pacientes. Esta técnica foi realizada nas amostras de 75% dos pacientes, e apresentou área de endureção variando de 7 a 16mm de diâmetro. A PCR foi realizada em amostras de 63,8% dos pacientes e foi positiva em 12 das 13 amostras (92,3%). A imunofluorescência indireta foi realizada em 33 pacientes, sendo positiva em 30 deles (90%). A pesquisa direta do parasita foi realizada em 21 pacientes (58,3% dos pacientes) sendo positiva em apenas 38% das amostras. A citometria de fluxo, por sua vez, foi positiva em 7 das 8 amostras avaliadas (87,5%). O western blot foi realizado em amostras de apenas 4 pacientes do estudo, sendo positivo em todas elas (Tabelas 2, 3 e 4).

**Tabela 2** - Diagnóstico laboratorial dos pacientes curados espontaneamente dos participantes do ensaio de dosagem sérica de citocinas.

Nº de registro do Paciente	Grupo de Estudo			
	IDRM <sup>1</sup>	Pesq. Direta <sup>2</sup>	IFI <sup>3</sup>	Amostras obtidas
1	10mm	+	+	CE
2	10mm	N/R	+	CE
3	10mm	N/R	+	CE
4	8mm	N/R	+	CE
5	10mm	N/R	+	CE
6	7mm	N/R	+	CE
7	10mm	N/R	+	CE
8	8mm	N/R	+	CE

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: <sup>1</sup>IDRM: Intradermoreação de Montenegro; <sup>2</sup>Pesq. direta: Pesquisa direta; <sup>3</sup>IFI: Imunofluorescência indireta; +: positivo; -: negativo; N/R: Não realizado; CE: Cura espontânea



**Tabela 3** - Diagnóstico laboratorial dos pacientes antes e após tratamento dos participantes do ensaio de dosagem sérica de citocinas.

Nº de registro do Paciente	Grupo de Estudo				
	IDRM <sup>1</sup>	Pesq. Direta <sup>2</sup>	IFI <sup>3</sup>	PCR <sup>4</sup>	Amostras obtidas
9	8mm	-	+	+	AT/PT
10	10mm	+	+	+	AT/PT
11	10mm	-	+	N/R	AT/PT
12	8mm	-	+	N/R	AT
13	12mm	-	+	N/R	AT/PT
14	N/R	-	+	+	AT/PT
15	10mm	-	+	+	AT/PT
16	10mm	-	+	+	AT
17	11mm	-	+	N/R	AT
18	14mm	-	+	+	AT
19	16mm	-	-	+	AT/PT
20	14mm	+	-	+	AT/PT
21	9mm	+	-	+	AT/PT
22	14mm	+	+	+	AT
23	10mm	-	+	+	AT/PT
24	N/R	-	+	N/R	AT
25	8mm	+	+	N/R	AT
26	8mm	N/R	+	-	AT
27	10mm	+	N/R	N/R	PT
28	10mm	+	N/R	N/R	PT
29	N/R	-	+	+	PT

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: <sup>1</sup>IDRM: Intradermorreação de Montenegro; <sup>2</sup>Pesq. direta: Pesquisa direta; <sup>3</sup>IFI: Imunofluorescência indireta; <sup>4</sup>PCR: Reação em cadeia da polimerase; +: positivo; -: negativo; N/R: Não realizado; AT: Antes do tratamento; PT: Pós-tratamento.

**Tabela 4** - Diagnóstico laboratorial dos pacientes antes do tratamento participantes do ensaio de imunofenotipagem e do ensaio de dosagem sérica de citocinas.

Nº de registro do Paciente	Grupo de Estudo				
	IDRM <sup>1</sup>	Citometria	IFI <sup>2</sup>	Western Blot	Amostras obtidas
<b>30</b>	8mm	+	+	+	AT
<b>31</b>	N/R	+	+	+	AT
<b>32</b>	N/R	+	+	+	AT
<b>33</b>	N/R	+	N/R	+	AT
<b>34</b>	N/R	-	+	N/R	AT
<b>35</b>	N/R	+	+	N/R	AT
<b>36</b>	N/R	+	+	N/R	AT

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: <sup>1</sup>IDRM: Intradermorreação de Montenegro; <sup>2</sup>IFI: Imunofluorescência indireta; +: positivo; -: negativo; N/R: Não realizado; AT: Antes do tratamento.

## 9.2 Percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em cultura de células de pacientes com LTA ativa

Visando demonstrar o perfil de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> durante a resposta imunológica de pacientes com LTA, foi realizada uma comparação do percentual destas células no sangue periférico de 7 pacientes com lesão ativa e 10 controles. O processamento das células se deu após cultura de 6 horas com estímulo mitogênico com PMA e ionomicina. Observou-se diminuição na proporção de linfócitos CD3<sup>+</sup> de pacientes em comparação aos controles ( $p = 0,0020$ ). Também foi verificada diminuição na proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes em comparação aos controles ( $p = 0,0312$ ). No entanto, esta diminuição não influenciou na razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> observada. Além disso, os percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em pacientes e controles foram semelhantes (Tabela 5).

**Tabela 5** - Comparação da média do percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em pacientes com LTA ativa (PC) e controles (CT).

	CT	PC	p
%CD3 <sup>+</sup>	72,37±5,99	56,16±5,25	0,0020
%CD4 <sup>+</sup>	40,35±7,74	31,13±5,26	0,0312
%CD8 <sup>+</sup>	26,97±7,96	21,79±7,03	0,1331
Razão CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1,67±0,72	1,57±0,55	0,9578

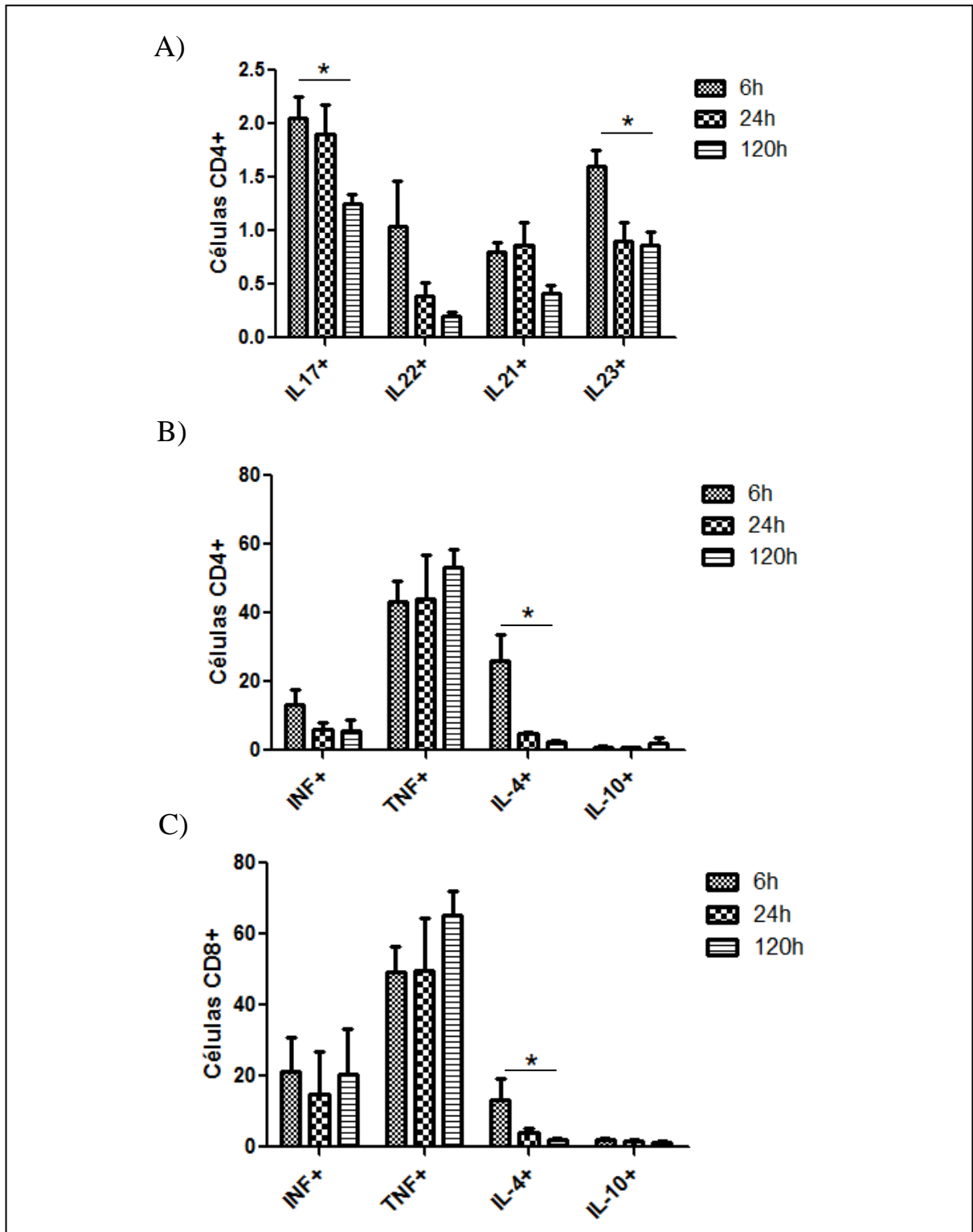
Fonte: Elaborada pela autora.

### 9.3 Padronização do tempo de cultura para análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas após estímulo com mitógenos

Inicialmente foi realizada uma avaliação do tempo de cultura de linfócitos para verificar o melhor período de produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23. Para isso, os tempos de 6, 24 e 120 horas de cultura foram testados. Os testes foram feitos com seis pacientes portadores de lesão ativa. Maior produção de IL-17 foi observada no tempo de 6 horas de cultura ( $p = 0,0470$ ). Foi observada também maior produção de IL-23 no tempo de 6 horas ( $p = 0,0183$ ) (Figura 13-A). Não foi observada diferença estatística na produção de IL-21 e IL-22 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os tempos.

Avaliando-se a produção de citocinas do perfil Th1 e Th2 por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, foi observada uma produção significativa maior de IL-4 em 6 horas de cultura ( $p = 0,0017$ ) (Figura 13-B). Além disso, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> também produziram mais IL-4 no tempo de 6 horas quando comparado aos outros tempos avaliados ( $p = 0,0034$ ) (Figura 13-C). Não foi observada diferença estatística na produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os tempos.

**Figura 13** - Produção de citocinas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A e B) e T CD8<sup>+</sup> (C) de pacientes com LTA ativa nos tempos de 6, 24 e 120h após estímulo com mitógenos.



Fonte: Elaborado pela autora.

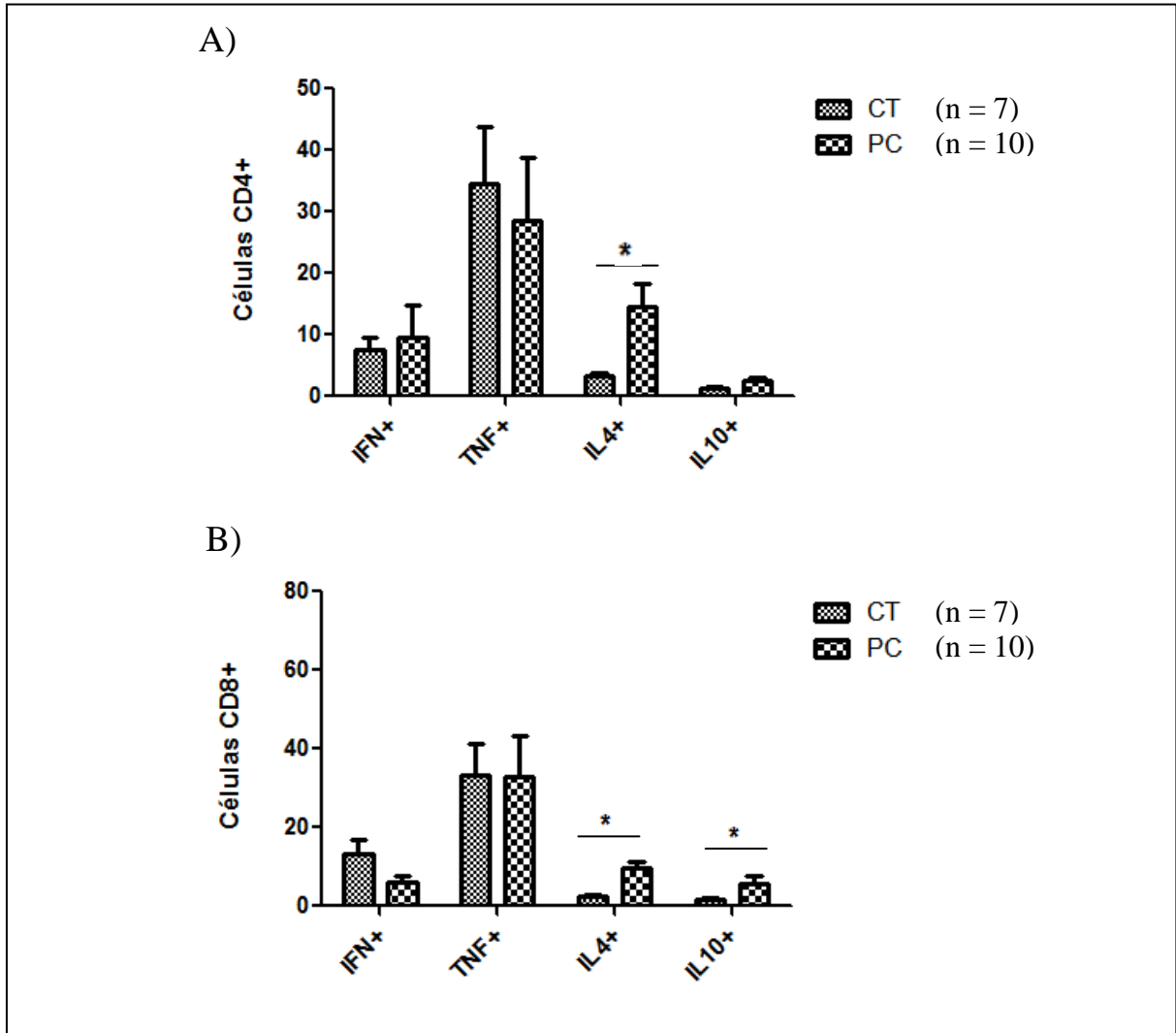
Nota: Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05 e sendo representadas por “\*”.

#### **9.4 Avaliação da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>**

Tendo em vista os resultados obtidos na padronização do tempo de cultivo das células, o tempo de 6 horas de cultura foi escolhido para a avaliação da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Foi observada produção significativa maior da citocina IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> ( $p = 0,0002$ ) e CD8<sup>+</sup> ( $p = 0,0020$ ) em pacientes antes do tratamento, em comparação aos indivíduos do grupo controle (Figura 14). Foi observada também maior produção de IL-10 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> em pacientes antes do tratamento em comparação aos controles ( $p = 0,0136$ ). Não foi observada diferença estatística na produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

Além disso, foi observado aumento significativo na produção de IL-17 ( $p = 0,0136$ ) e IL-23 ( $p = 0,0004$ ) por linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes antes do tratamento em comparação aos controles (Figura 15). Embora sem valor significativo, também foi verificada maior produção das citocinas IL-21 e IL-22 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes antes do tratamento em comparação aos controles (dados não apresentados).

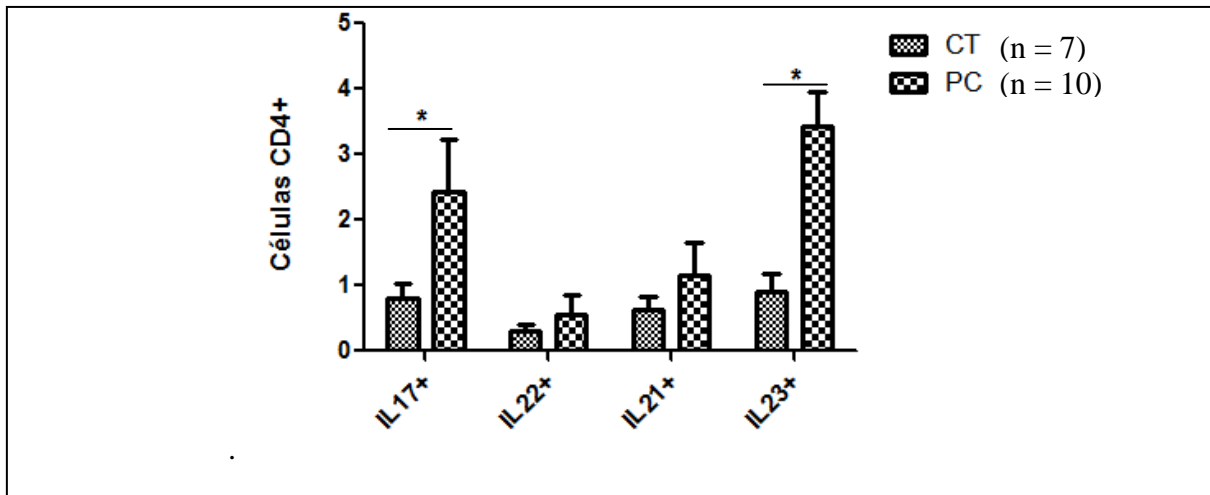
**Figura 14** - Produção de citocinas Th1 e Th2 por linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) em pacientes com LTA antes do tratamento (PC) e controles (CT).



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05 e sendo representadas por “\*”.

**Figura 15** - Produção de citocinas do perfil Th17 por linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) em pacientes com LTA antes do tratamento (PC) e controles (CT).

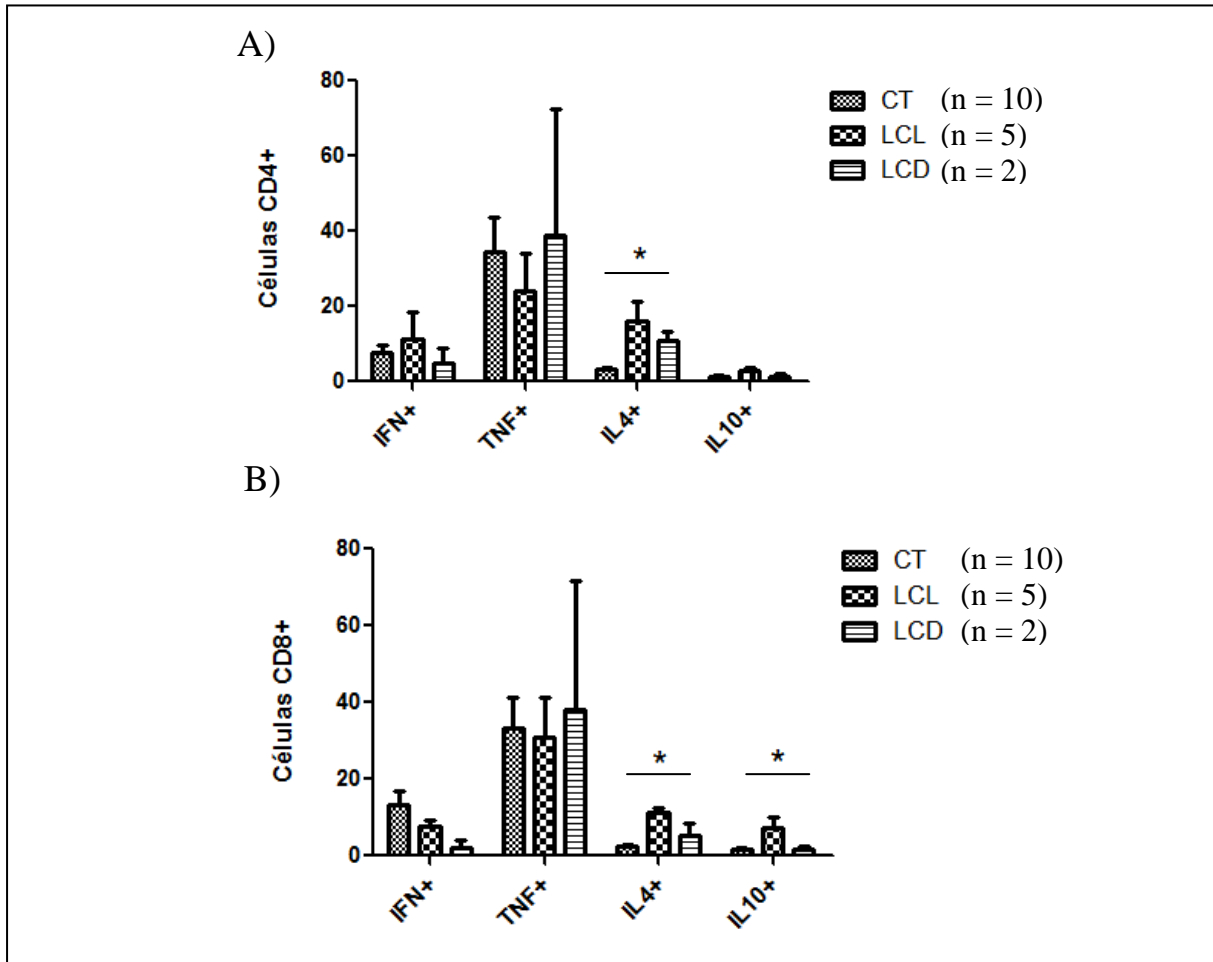


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05 e sendo representadas por “\*”.

No entanto, ao dividir os pacientes em grupos, em que em um grupo constavam cinco pacientes com lesão única (LCL) e, em outro, dois pacientes com múltiplas lesões (LCD), as diferenças estatísticas na produção de citocinas se mantiveram. Foi possível observar produção significativa maior de IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> ( $p = 0,0040$ ) e T CD8<sup>+</sup> ( $p = 0,0063$ ) nos pacientes com lesão única e produção significativa maior de IL-10 por células T CD8<sup>+</sup> ( $p = 0,0162$ ) nos mesmos (Figura 16). Quanto às citocinas do perfil Th17, diferença estatística na produção de IL-17 e IL-23 entre os grupos também continuou a ser observada ( $p = 0,0205$  e  $p = 0,0054$ , respectivamente) (Figura 17).

**Figura 16** - Produção de citocinas por linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) em controles (CT) e pacientes com lesão ativa única (LCL) e múltiplas lesões (LCD).

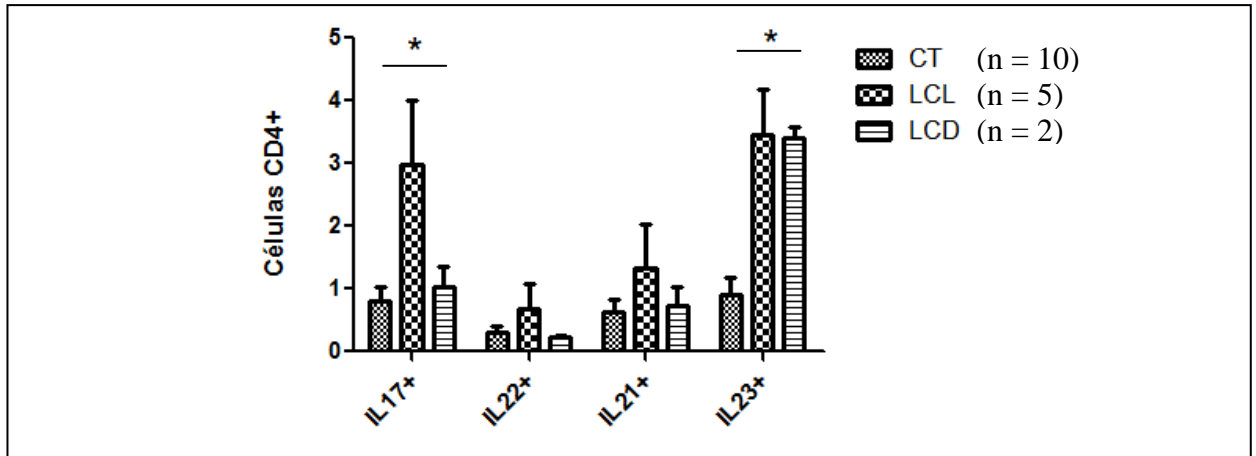


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05 e sendo representadas por “\*”.



**Figura 17** - Produção de citocinas do perfil Th17 por linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) em controles (CT) e pacientes com lesão ativa única (LCL) e múltiplas lesões (LCD).



Fonte: Elaborado pela autora.

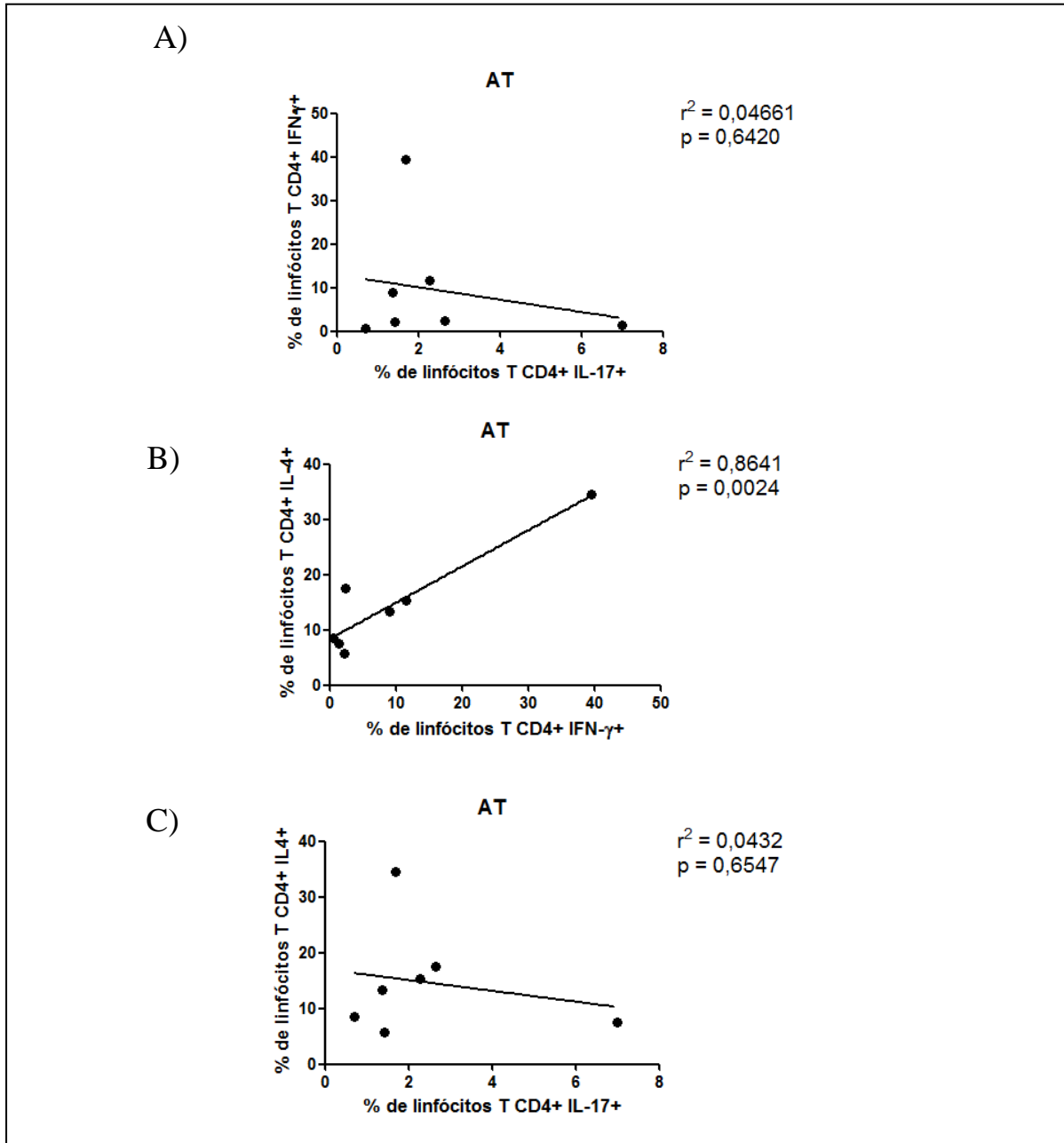
Nota: Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05 e sendo representadas por “\*”.

### 9.5 Associação entre a produção de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17

Para verificar a possível existência de associações entre os perfis de produção de citocinas, a produção de citocinas consideradas definidoras para diferentes perfis foram comparadas: Th1xTh2 (IFN- $\gamma$  x IL-4), Th17xTh1 (IL-17 x IFN- $\gamma$ ) e Th17xTh2 (IL-17 x IL-4) (Figura 18).

Em um modelo de regressão linear foi observada associação positiva entre a produção de citocinas dos perfis Th1 e Th2 em pacientes com lesão ativa ( $p = 0,0024$ ,  $r^2 = 0,8641$ ) (Figura 18-A).

**Figura 18** - Associação entre os perfis Th17 x Th1, Th1 x Th2 e Th17 x Th2 em pacientes com LTA ativa.



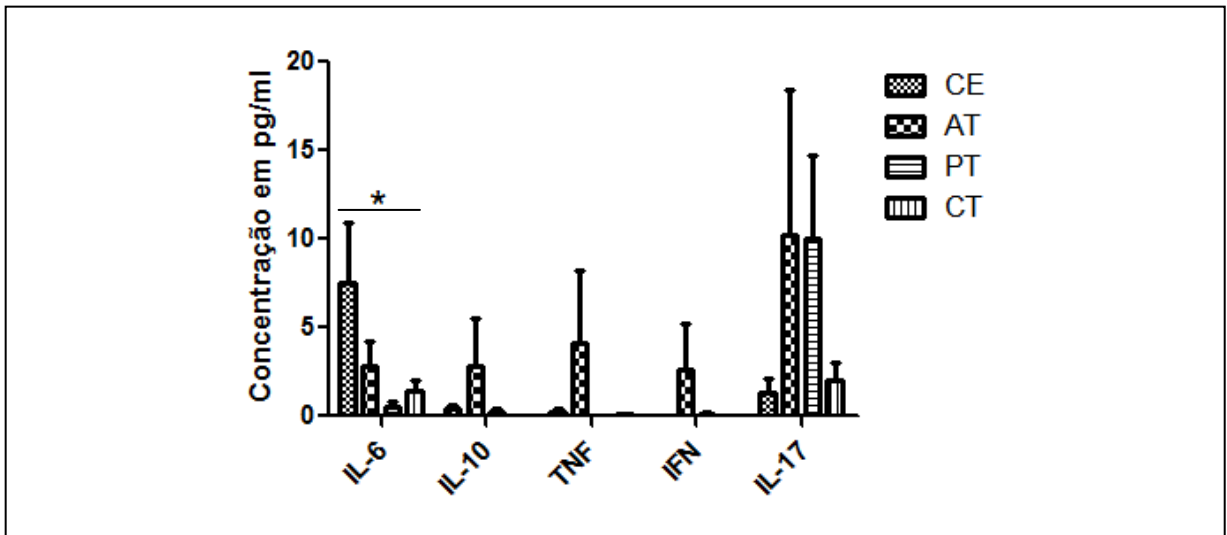
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

### 9.6 Dosagem de citocinas no soro de pacientes com LTA através de citometria de fluxo

A dosagem sérica das citocinas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 foi realizada utilizando-se o kit CBA. Foi observado que os soros de pacientes com cura espontânea apresentavam IL-6 em níveis significativos maiores em comparação aos soros de pacientes após o tratamento quimioterápico e aos controles ( $p=0,0007$ ) (Figura 19).

**Figura 19** - Concentração sérica de citocinas em pacientes com LTA ativa (AT), após o tratamento quimioterápico (PT), pacientes que apresentaram cura espontânea (CE) e controles (CT).



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de  $p$  foi inferior a 0,05 e sendo representadas por “\*”.

## 10 Discussão

---

A patogênese da LTA está relacionada a interações entre a resposta inata e adaptativa do sistema imune do hospedeiro, assim como a fatores nutricionais e constituição genética do mesmo (REIS *et al.*, 2009). As infecções por *Leishmania* apresentam um espectro de manifestações clínicas, variando de formas assintomáticas a formas cutâneas e mucocutâneas (BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2009). A avaliação da resposta imune do hospedeiro é essencial na busca por novas estratégias para testes prognósticos, imunoprevenções e imunoterapias. Indivíduos que apresentam cura espontânea das lesões são de fundamental importância para o entendimento dos fatores imunológicos que contribuem para a cura da doença.

No homem, a LTA pode ocorrer em quatro principais manifestações: a forma cutânea localizada, cutâneo-difusa, mucocutânea e disseminada (BRASIL, 2007; DESJEUX, 2004). Nesse estudo, observamos aspectos epidemiológicos e avaliamos a resposta imune de indivíduos portadores da forma cutânea da LTA, residentes em áreas endêmicas da Zona da Mata do estado de Pernambuco.

Reithinger *et al.* (2007) propõe que ciclos de transmissão da doença se adaptam a ambientes peridomésticos e se espalham por áreas previamente não endêmicas. Isso pode ocorrer como um resultado da urbanização e desflorestamento, com animais domésticos como potenciais hospedeiros. O padrão de distribuição da doença em ambientes peridomésticos e onde há desmatamento descrito pelo autor corresponde com a situação dos municípios endêmicos estudados. Muitas vezes a transmissão da doença nesses municípios ocorre majoritariamente em engenhos localizados na periferia das cidades, em ambientes próximos a matas onde há progressivo desmatamento.

Além disso, nossos achados epidemiológicos corroboram com o descrito por este autor, quanto à discreta predominância de homens observada no grupo de indivíduos infectados. O autor pontua que o sexo do indivíduo pode ser um fator de risco devido a fatores comportamentais que aumentam a exposição. Foi observada, nesse estudo, uma maior prevalência de indivíduos do sexo masculino, podendo ser devido ao tipo de trabalho executado por esses indivíduos, em sua maioria envolvendo atividades agrícolas situadas próximas a matas, aumentando a exposição ao vetor.

A média de idade dos pacientes foi de 33 anos, com pacientes entre 14 e 69 anos. Houve predominância de indivíduos com lesão única (forma cutânea localizada), com ocorrência de lesões ulceradas, com bordas elevadas e fundo granulomatoso. Neste estudo, onze pacientes apresentaram 2 ou mais lesões. Segundo Gontijo e Carvalho (2003) a lesão primária é geralmente única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões.

Na ocorrência de lesões típicas de leishmaniose, o diagnóstico clínico e epidemiológico pode ser realizado, especialmente se o paciente procede de áreas endêmicas ou esteve presente em lugares onde há casos de leishmaniose. O diagnóstico clínico-epidemiológico pode ser complementado pela IDRМ positiva e eventualmente pela resposta terapêutica. Entretanto, a confirmação desse diagnóstico por métodos laboratoriais é fundamental tendo em vista o número de doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA (BRASIL, 2007).

Todos os pacientes foram diagnosticados com leishmaniose tegumentar. O diagnóstico se deu observando-se aspectos clínicos e epidemiológicos, através de consulta feita com médico dermatologista além do inquérito epidemiológico, e laboratoriais, servindo-se dos exames intradermorreação de Montenegro, pesquisa direta do parasita nas lesões, imunofluorescência indireta, reação de cadeia em polimerase para pesquisa de DNA parasitário (PCR), citometria de fluxo e western blot. Os pacientes foram considerados positivos quando, além do diagnóstico clínico a doença foi confirmada em pelo menos dois destes exames laboratoriais.

Entre os diagnósticos laboratoriais utilizados foi realizada a intradermorreação de Montenegro (IDRM). Entre nossos pacientes, 75% foram testados utilizando este método. A reação se apresentou positiva em todos eles, com área de endureção variando de 7 a 16mm de diâmetro. A IDRМ é utilizada rotineiramente na prática clínica para a avaliação da imunidade celular anti-*Leishmania*. É um teste de grande valor diagnóstico para a LTA, apresentando positividade entre 84% e 100% nas formas cutâneas e mucocutâneas, respectivamente, de leishmaniose (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A PCR foi realizada em amostras de 63,8% dos pacientes, sendo positiva em 12 das 13 amostras (92,3%). Esta técnica apresenta grande sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar baixas quantidades de parasitas na infecção (AMEEN, 2010).

A imunofluorescência indireta foi realizada em 33 pacientes, sendo positiva em 30 deles (90%). Esta ferramenta apresenta uma sensibilidade entre 41,4% e 81,9%. A positividade

deste exame está associada ao tempo de evolução da doença, e resultados negativos podem ser observados quer pela reduzida antigenicidade do parasita ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes (BRASIL, 2007; SOUZA *et al.*, 1982).

A pesquisa direta do parasita foi realizada em 21 pacientes (58,3% dos pacientes) sendo positiva em apenas 38% das amostras. Esse valor se aproxima do encontrado em estudos realizados por diferentes grupos de pesquisa, que sugerem que a pesquisa direta tem baixa sensibilidade, com percentuais que variam de 15-30% de positividade (GOTO; LINDOSO, 2010). De modo geral, as formas amastigotas são mais abundantes na fase inicial da doença, tornando-se rara em lesões antigas (resultados falso-negativos). Este exame deve ser realizado antes do início do tratamento, pois parasitas desaparecem logo após instituição da terapêutica antimonial (AMEEN, 2010).

A citometria de fluxo foi positiva em 7 das 8 amostras avaliadas (87,5%). A citometria de fluxo permite a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em amostras de soro, sendo uma ferramenta de grande sensibilidade e aplicabilidade ao diagnóstico da leishmaniose (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O western blot, por sua vez, foi realizado em amostras de apenas 4 pacientes do estudo, sendo positivo em todas elas. O western blot é uma técnica que consiste na detecção de proteínas específicas em amostras de tecidos ou soro (MARY *et al.*, 1992). Por motivos operacionais alguns dos pacientes não puderam ser diagnosticados por todos os métodos citados.

Uma vez confirmado o diagnóstico, o tratamento é iniciado, sendo este baseado primariamente na administração de sais de antimoniais pentavalentes por via intramuscular (BRASIL, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007). No entanto, o tratamento é caro e apresenta alta toxicidade, justificando a procura de terapias alternativas que poderiam reduzir a necessidade destas drogas (GOTO; LINDOSO, 2010; REITHINGER *et al.*, 2007). Para a eficácia dos antimoniais pentavalentes no tratamento da leishmaniose, uma eficiente resposta mediada por célula é requerida, estando esta resposta imunossuprimida quando há infecção (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; SANTOS *et al.*, 2008). Dessa maneira, a relação entre imunocompetência e quimioterapia nas infecções causadas por *Leishmania* e o seu estudo são de grande importância clínica para o hospedeiro.

Para um melhor entendimento da resposta imune na LTA, no presente estudo a citometria de fluxo foi utilizada na determinação da percentagem das populações celulares pesquisadas.

Esta técnica permite contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido através da emissão de um feixe de laser sobre as amostras e detecção de fluorescências de diferentes intensidades e comprimentos de onda (BD BIOSCIENCES, 2000). Entre as várias aplicações da citometria de fluxo, encontra-se a imunofenotipagem, ou seja, a identificação de populações e subpopulações celulares com base em seus marcadores de superfície (BD BIOSCIENCES, 2000; BRITO, 2010).

A imunofenotipagem através da citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada na determinação do perfil de resposta celular na leishmaniose (DA-CRUZ *et al.*, 2005; GOLLOB *et al.*, 2008; PITTA *et al.*, 2009). Esse estudo teve como foco algumas das principais populações celulares já descritas na literatura pela sua importância na modulação da resposta imune celular nesta doença (BOTELHO; MAYRINK; OLIVEIRA, 2009; COUTINHO *et al.*, 1998; DA-CRUZ *et al.*, 1994). Além disso, foi avaliada também a produção e secreção de citocinas por estas populações celulares.

Os linfócitos T atuam no reconhecimento de antígenos de microorganismos intracelulares, destruindo-os ou destruindo as células infectadas. Os linfócitos T compreendem populações funcionalmente distintas, entre elas as células T auxiliares ( $CD3^+CD4^+$ ) e os linfócitos T citolíticos ou citotóxicos ( $CD3^+CD8^+$ ). As células T auxiliares atuam através da secreção de citocinas, que estimulam a proliferação e diferenciação de células T e ativação de diversos tipos celulares. As células T citotóxicas atuam, além da secreção de citocinas, através da citólise de células infectadas por vírus e outros microorganismos intracelulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; PERES; NARDI; CHIE, 2003).

Sabe-se que infecções por *Leishmania* induzem uma resposta específica do hospedeiro, e a resposta por células T é muito importante para o desfecho da doença (REIS *et al.*, 2006). O marcador CD3 indica a presença de células T. Alterações na razão de células T  $CD4^+/CD8^+$  podem indicar predominância de resposta por células auxiliares ou citotóxicas (BELKAID, 2008).

Nesse estudo, foi observada uma maior proporção de linfócitos T ( $CD3^+$ ) e T auxiliares ( $CD4^+$ ) em controles em comparação aos pacientes, sugerindo que estas células estejam envolvidas na proteção à doença. Em camundongos, linfócitos T  $CD4^+$  podem apresentar tanto papel protetor como promover o desenvolvimento da doença, a depender do perfil de citocinas secretadas (DA-CRUZ *et al.*, 1994). Há estudos que sugerem que a resposta por células T  $CD4^+$  confira resistência em infecções por *Leishmania* (BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012; CHAN, 1993; DA-CRUZ *et al.*, 1994). Segundo Da-Cruz *et al.* (2005), no Brasil,

diferentes razões de distribuição de células T tem sido encontradas, havendo tanto predominância de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, e mesmo equivalência na proporção desses dois tipos celulares têm sido descritas.

Além disso, a diferenciação em diferentes perfis de secreção de citocinas é importante no desenlace da doença. Em humanos, a resposta do tipo Th1, com produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  tem sido relacionada com o controle da infecção, através da ativação de macrófagos com produção de óxido nítrico e destruição do parasita. A resposta do tipo Th2, por sua vez, atua através da produção de citocinas como IL-4, IL-10, IL-5 e IL-13, dificultando a morte intracelular do parasita e favorecendo a sua multiplicação, com inibição da produção de NO por macrófagos ativados. Estas citocinas atuam também inibindo a diferenciação de células no perfil de secreção de citocinas Th1 (BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012; DA-CRUZ *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2006).

Em nossos ensaios, maior produção de IL-4 foi observada tanto por linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto por linfócitos T CD8<sup>+</sup>. IL-4 é uma citocina que define o perfil Th2. IL-4 está envolvida na inativação de macrófagos inflamatórios e regulação da indução de células Th2, além da inibição da diferenciação de células Th1 (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; KAMALI-SARVESTANI *et al.*, 2006). Esta inibição do desenvolvimento de resposta Th1 pode se dar via numerosos mecanismos, como a regulação negativa da cadeia IL12R $\beta$ 2 e regulação do fator de transcrição T-bet, que controla a expressão de IFN- $\gamma$  (O'GARRA *et al.*, 2004). Estudos anteriores do nosso grupo também revelaram a expressão de citocinas com um perfil Th2 em culturas de pacientes com LTA ativa, indicando a existência de uma imunomodulação no início da infecção (BRELAZ *et al.*, 2012).

Além disso, observamos também produção de IL-10 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes em comparação aos controles. IL-10 é uma citocina regulatória e que está implicada também à resposta Th2, além de participar na estimulação do perfil Th3, com diferenciação de células regulatórias (BELKAID, 2008). IL-10 atua inibindo a produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  por macrófagos ativados (FIORENTINO *et al.*, 1991). Embora a resposta Th1 seja benéfica, o controle da resposta inflamatória também é essencial para a cura da doença. A produção de IL-10, inicialmente relacionada apenas ao favorecimento da sobrevivência parasitária no hospedeiro induzindo a desativação macrofágica, pode representar um contrabalanço necessário para a resolução da doença (ANTONELLI *et al.*, 2004; FIORENTINO *et al.*, 1991).



A maioria dos trabalhos com LTA demonstram um perfil misto Th1/Th2 em pacientes com lesão ativa (BOTTREL *et al.*, 2001; CASTELLANO *et al.*, 2009; COUTINHO *et al.*, 1996; DA-CRUZ *et al.*, 2002; GOMES-SILVA *et al.*, 2007). Embora não significativa, observamos níveis séricos mais altos de IL-10 em pacientes antes do tratamento em comparação aos pacientes que apresentaram cura espontânea. O mesmo foi observado entre pacientes após o tratamento e controles. Por outro lado, a produção de IL-10 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> observada na imunofenotipagem foi significativa, comparando-se pacientes em relação ao controle. Isso sugere que, logo após a exposição ao parasita, os pacientes desenvolvam uma resposta imunológica com possível diferenciação de Tregs, permitindo a sobrevivência parasitária e desenvolvimento da lesão (BELKAID, 2007).

Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram uma maior proporção de linfócitos T CD25<sup>+</sup> em pacientes após o tratamento quando comparados aos pacientes antes do tratamento. Essa proporção maior foi observada também ao comparar pacientes antes do tratamento com os controles. Isso reforça a idéia de que células regulatórias contribuam para o balanço da resposta imunológica no hospedeiro (ALMEIDA *et al.*, 2011). Com o avanço da doença, a resposta inflamatória é suprimida dando margem para um balanço entre as respostas imunológicas. Esse balanço leva à manutenção da presença do parasita, importante para o estímulo da resposta. Quando há uma resposta regulatória muito intensa pode haver descontrole na multiplicação do parasita. Em compensação, esta resposta regulatória pode atuar no controle de respostas inflamatórias exacerbadas que podem ser danosas ao tecido do hospedeiro. Segundo Mendez *et al.* (2004), a persistência de um número de parasitas na infecção latente é necessária para uma imunidade duradoura contra *Leishmania*.

Similarmente aos perfis Th1 e Th2, a resposta Th17 é orquestrada pela secreção de citocinas específicas. Ela é ativada por uma combinação das citocinas IL-6 e TGF- $\beta$ , e leva à produção de citocinas como IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23. A resposta Th17 é um importante fator presente em processos patológicos como inflamação e doenças auto-imunes, mas também na resposta inicial contra patógenos (KAUFMANN; KUCHROO, 2009; OUKKA, 2007; SCHMIDT-WEBER; AKDIS; AKDIS, 2007).

No que concerne as citocinas do perfil Th17, observamos uma maior produção de IL-17 em pacientes com lesão ativa em comparação aos controles. Isso ocorreu não apenas em pacientes com lesão única, mas também em pacientes com múltiplas lesões. Através da sinalização pelo receptor IL-17RA, IL-17 pode induzir a produção de diferentes tipos de proteínas, muitas relacionadas à inflamação, incluindo quimiocinas (CXCL-1, CXCL-2,

CXCL-8-10, CCL-2, CCL-20), citocinas (IL-6, TNF $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF), proteínas da resposta de fase aguda, fatores de remodelamento de tecidos (MMP1, MMP3, MMP9, MMP13, TIMP2), e produtos anti-microbianos ( $\beta$ -defensinas, mucinas, calgranulinas) (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2013). Sabe-se também que IL-17 é um potente ativador de neutrófilos. Níveis aumentados desta citocina são responsáveis pela migração de neutrófilos, principalmente via CXCL2 (KOSTKA *et al.*, 2009), o que pode contribuir na resposta imune inata contra o patógeno.

Estudos avaliando o papel de IL-17 em outras infecções têm mostrado que a produção desta citocina apresenta papel na imunidade protetora contra diversos fungos e bactérias, como no caso de infecções por *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (HAPPEL *et al.*, 2003; MATSUZAKI; UEMURA, 2007). IL-17 também apresenta papel protetor na imunidade contra parasitas, como nos casos das infecções pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Pacientes com cardiopatia leve ou ausente apresentaram maior produção de IL-17 por linfócitos CD4<sup>+</sup> (GUEDES *et al.*, 2012). Além disso, estudos mostram que a produção de IL-17 parece regular IL-1 $\alpha\beta$  em diversas condições patológicas. IL-1 derivado de células dendríticas é importante para uma eficiente indução da resposta Th1 na leishmaniose (KOSTKA *et al.*, 2009).

Em humanos, outros trabalhos mostraram que IL-17 está presente na fase inicial de formas cutâneas da leishmaniose, levando à conclusão de que esta citocina poderia ser prejudicial na resolução da doença (BACELLAR *et al.*, 2009; KOSTKA *et al.*, 2009; NOVOA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012). Por outro lado, Novoa *et al.* (2011) observaram um aumento nos níveis de IL-17 em indivíduos com infecção subclínica, em comparação a pacientes com lesões ativas, concluindo que esta citocina possui papel protetor na resposta imune contra *Leishmania*. Pitta *et al.* (2009) também mostraram que *L. donovani*, um agente da leishmaniose visceral, induz fortemente a produção de IL-17 e IL-22 por PBMCs em indivíduos saudáveis, sugerindo que esta citocina apresente papel protetor em infecções por *Leishmania*.

Acreditamos que a maior proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IL-17 observadas nos pacientes com lesão ativa indique uma resposta inicial do hospedeiro contra o patógeno. Essa resposta inflamatória inicial pode ser importante para a resolução da infecção. Por outro lado, se exacerbada, pode levar a dano tecidual e acometimento de lesões.

Em nossos estudos, foi observada também maior proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IL-23 em pacientes com lesão ativa, quando comparados aos controles. A

função de IL-23 na promoção da expansão celular tem sido proposta. Estudos sugerem que IL-23 mantém o fenótipo Th17. Por outro lado, tem sido demonstrado que IL-23 mantém as funções patogênicas das respostas Th17 comparadas com culturas sob estímulo de TGF- $\beta$  e IL-6, a depender da produção de IL-10 por células Th17 (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2013). A maior proporção de células produtoras de IL-23 observada em nossos estudos reforça a ideia de que a resposta Th17 esteja bem estabelecida nos pacientes com lesão ativa avaliados.

Estudos recentes também têm implicado IL-23 e IL-17 na imunidade contra patógenos extracelulares, como bactérias (*Klebsiella pneumoniae*), protozoários (*Toxoplasma gondii*) e fungos (*Cryptococcus neoformans*). Entretanto, estudos mostram que níveis aumentados de IL-23 e IL-17 em infecções por *Schistosoma mansoni* estão associados à exacerbação da doença (KHADER; GOPAL, 2010; RUTITZKY; LOPES DA ROSA; STADECKER, 2005).

Maiores níveis séricos de IL-6 foram observados em pacientes curados espontaneamente e nos pacientes com a doença ativa comparados com aqueles após o tratamento. IL-6, entre outras funções, atua na promoção da resposta do tipo 17. Os níveis aumentados desta citocina nos pacientes que apresentaram cura espontânea e pacientes com lesão ativa indicam que há um estímulo para o estabelecimento de uma resposta Th17 nestes pacientes. Níveis aumentados desta citocina nos pacientes que apresentaram cura espontânea nos levam à conclusão de que a mesma pode apresentar um papel importante na resolução da doença. Além disso, os níveis aumentados em pacientes com lesão ativa reforçam a ideia de uma imunomodulação no início da infecção.

Além da caracterização de cada perfil de resposta imune na população estudada, foi importante verificar a relação entre eles. Para isso, foi feita a associação entre os perfis Th1, Th2 e Th17, considerando como citocinas representantes desses perfis, respectivamente, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17. Ao analisar essa associação, observamos associação positiva entre Th1 e Th2 em pacientes com lesão ativa.

A associação positiva entre Th1 e Th2 observada nos pacientes com lesão ativa reflete um perfil misto da resposta imunológica que pode levar a uma desregulação nos perfis de secreção de citocinas observada nesses pacientes (DA-CRUZ *et al.*, 2005). No entanto, há a possibilidade deste perfil misto estar sendo observado em decorrência do tipo de estímulo utilizado em nossos experimentos, pois os mitógenos utilizados estimulam uma resposta policlonal e inespecífica (KIM *et al.*, 2000). Estas citocinas têm sido associadas a mecanismos de proteção (perfil Th1) e de patogênese (perfil Th2) na LTA. Sabe-se que a sua quantidade,

produção balanceada e momentos de liberação são determinantes na evolução da doença, sendo o balanço entre os perfis de citocinas importante para a cura clínica (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007, BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013).

A produção simultânea de IL-4, IL-10 e IL-17, observada no início da infecção nos pacientes do presente estudo, sugere uma desregulação imunológica temporária e mecanismos reguladores que envolvem a citocina IL-10. Essas respostas parecem estar diretamente relacionadas com o desfecho da doença (BACELLAR *et al.*, 2009; BELKAID, 2007; DA-CRUZ *et al.*, 2002; PITTA *et al.*, 2009).

Deste modo, conforme evidenciado pelos nossos resultados, acreditamos que um balanço adequado entre as respostas que induzam a atividade anti-parasitária, aquelas que induzam lesões teciduais, e aquelas que mantenham a persistência parasitária, pode ser o mais adequado para uma melhor resolução das patologias causadas por infecções por *L. (V.) braziliensis*.

## 11 Conclusões

---

A) O maior percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> observado em controles, comparado aos pacientes com lesão ativa, indica participação destas células na proteção contra o aparecimento de lesões;

B) A presença da citocina inibitória IL-4 e da citocina regulatória IL-10, demonstram uma desregulação da resposta imune na doença ativa, que pode contribuir para o acometimento de lesões;

C) A presença de IL-17 e IL-23 em pacientes com lesão ativa comprovam que essas citocinas estão presentes na resposta inicial ao parasita. Estas citocinas podem ser importantes para o combate ao parasito, porém, ao mesmo tempo, podem levar a danos teciduais.

D) A presença de níveis mais altos de IL-6 em pacientes que apresentaram cura espontânea, sugere que a promoção da resposta Th17 seja benéfica na resolução de infecções por *L. (V.) braziliensis*.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. Imunologia celular e molecular. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. Clinical and experimental dermatology, Nova Iorque, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.
- ANDRADE, M. S. *et al.* Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 229-233, 2005.
- ANTONELLI, L. R. *et al.* Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. Clinical and Experimental Immunology, Oxford, v. 136, p. 341-348, 2004.
- BACELLAR, O. *et al.* IL-17 Production in Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. Journal of infectious disease, Oxford, v.200, n.1, p. 75-78, 2009.
- BARATTA-MASINI, A. *et al.* Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. Frontiers in Bioscience, Albertson, v. 12, p. 839-849, 2007.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v.7, n. 3, p. 328-337, 2004.
- BD Biosciences. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide (Manual Part Number: 11-11032-01). Disponível em: [http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med\\_80691.pdf](http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf). Acesso em: 10 set. 2012.
- BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. Nature reviews - immunology, London, v. 7, p. 875-888, 2007.
- BELKAID, Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. European Journal of Immunology, Weinheim, v.38, p. 901-937, 2008.
- BETELLI E. *et al.* Induction and effector functions of Th17 cells. Nature, London, 453: 1051-1057, 2008.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. International Journal of Parasitology, Oxford, v. 28, n. 1, p. 121-134, 1998.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. Immunological Reviews, Malden, v. 173, p. 17-26, 2000.
- BOTELHO A. C.; MAYRINK, W.; OLIVEIRA R. C. Alterations in phenotypic profiles of peripheral blood cells from patients with human American cutaneous leishmaniasis following

treatment with an antimonial drug and a vaccine. Acta Tropica, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 143-148, 2009.

BOTTREL, R. L. A. *et al.* Flow Cytometric Determination of Cellular Sources and Frequencies of Key Cytokine-Producing Lymphocytes Directed against Recombinant LACK and Soluble Leishmania Antigen in Human Cutaneous Leishmaniasis. Infection and Immunity, Washington, v. 69, n. 5, p. 3232 – 3239, 2001.

BRANDÃO-FILHO, S. P. *et al.* American Cutaneous Leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological Aspects in 'Zona da Mata' Region. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 445-449, 1994.

BRANDÃO-FILHO, S. P. *et al.* Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p.

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. *et al.* Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. Cellular Immunology, Nova Iorque, v.279, n.2, p.180-186, 2012.

BRELAZ, M. C. A. B. *et al.* Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. Parasite Immunology, v. 34, p. 236–239, 2012.

BRITO, M. E. F. *et al.* Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 95, p. 203-206, 2001.

BRITO, M. E. F. *et al.* Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. Tropical Medicine and International Health, Malden, v. 14, n. 10, p. 1-9, 2009.

BRITO, D. V. S. Valor do estudo das Linfocitoses por Citometria de Fluxo. 2010. 57p. Dissertação (Mestrado). Universidade da Beira Interior, Faculdade de Ciências da Saúde, Mestrado Integrado em Medicina, Covilhã, 2010.

CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. Human Immunology, New York, v. 70, n. 6, p. 383-390, 2009.

CHAN, M. M. T cell response in murine *Leishmania Mexicana amazonensis* infection: production of interferon- $\gamma$  by CD8<sup>+</sup> cells. European Journal of Immunology, Weinheim, v.23, p. 1181-1184, 1993.

CHATILA *et al.*, Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. Journal of Immunology, Baltimore, v. 143, n. 4, p. 1283-1289, 1989.

COUTINHO, S. G. *et al.* T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. Experimental Parasitology, Orlando, v. 84, p.144-155, 1996.

COUTINHO, S. G. *et al.* Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, São Paulo, v. 31, p. 139-142, 1998.

COUTINHO, S. G., PIRMEZ, C., DA-CRUZ, A. M. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 96, p. 173-178, 2002.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. Drug Resistance in Leishmaniasis. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms of infection by *Leishmania*. Experimental and Molecular Pathology, New York, v. 72, p. 132-141, 2002.

DA-CRUZ, A. M. *et al.* *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. Infection and Immunity, Washington, v. 62, n. 6, p. 2614-2618, 1994.

DA-CRUZ, A. M. *et al.* T-cell mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Washington, v. 9, n. 2, p. 251-256, 2002.

DA-CRUZ, A.M.; BERTHO, A.L.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; COUTINHO, S.G. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. British Journal of Dermatology, v. 153, n. 3, p. 537-543, 2005.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, v. 27, p. 305-318, 2004.

DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. Nature reviews – immunology, London, v. 8, n. 5, p 337-48, 2008.

EYERICH S. *et al.* IL-17 and IL-22: siblings, not twins. Trends in Immunology, Oxford, v. 31, n. 9, p. 354-61, 2010.

FIORENTINO *et al.* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. Journal of Immunology, Baltimore, v. 147, n. 11, p. 3815-22, 1991.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 5 ed. Brasília: Coordenação de Vigilância Epidemiológica, 2000. 62 p.



- GOLLOB, K. J. *et al.* Immunoregulatory mechanisms and CD4–CD8– (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: A balancing act between protection and pathology. International Immunopharmacology, Amsterdam, v. 8, p. 1338-1343, 2008.
- GOMES-SILVA, A. *et al.* Can interferon- $\gamma$  and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection?. Clinical and Experimental Immunology, Malden, v. 149, p. 440–444, 2007.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
- GONZÁLEZ-GARCÍA, C. *et al.* The Th17 lineage: Answers to some immunological questions. Inmunología, Madrid, v. 28, n. 1, p. 32-45, 2009.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Review of Anti-Infective Therapy, Londres, v.8, p. 419-433, 2010.
- GREEN, S. G. *et al.* Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. Immunological Letters, v. 43, p. 87-94, 1994.
- GRIMALDI JR, G; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clinical Microbiology Reviews, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.
- HAPPEL, K.I. *et al.* Cutting Edge: Roles of Toll-Like Receptor 4 and IL-23 in IL-17 Expression in Response to *Klebsiella pneumoniae* Infection. Journal of Immunology, Baltimore, v. 170, p. 4432-4436, 2003.
- HOLZMULLER, P., BRAS-GONÇALVES, R., LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. Parasitology, London, v. 132, p. 519-32, 2006.
- JAMES, S. L. Role of Nitric Oxide in Parasitic Infections. Microbiological Reviews, Washington, v. 59, n. 4, p. 533–547, 1995.
- KAMALI-SARVESTANI, E. *et al.* Gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. Cytokine, London, v. 35, n. 3-4, p. 159-165, 2006.
- KAUFMANN, SH, KUCHROO, VK. Th17 cells. Microbes and infection, Paris, v. 11, n. 5, p. 579-83, 2009.
- KELLY, M.N. *et al.* Interleukin-17/Interleukin-17 Receptor-Mediated Signaling Is Important for Generation of an Optimal Polymorphonuclear Response against *Toxoplasma gondii* Infection. Infection and immunity, Washington, v. 73, n. 1, p. 617-621, 2005.
- KHADER, S.A.; GOPAL, R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. Virulence, Austin, v. 5, n. 1, p. 423-427, 2010.
- KHARAZMI, A. *et al.* T cell response in human leishmaniasis. Immunology Letters, Amsterdam, v.65, p. 105-8, 1999.

KIM, H. M. *et al.* Immunomodulating activity of a polysaccharide isolated from Mori Cortex Radicis. Archives of Pharmacal Research, Seoul, v. 23, n. 3, p. 240-242, 2000.

KOSTKA, S.L. *et al.* IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. Journal of Immunology, Baltimore, v. 182, p. 3039-46, 2009.

LIEW, F Y; *et al.* Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. Immunology, Oxford, v. 69, p. 570-573, 1990.

MARY C. *et al.* Western blot analysis of antibodies to Leishmania infantum antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 47, n. 6, p. 764-71, 1992.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. Journal of Basic Microbiology, Berlin, v. 63, n. 5-6, p. 82-104, 1992.

MATSUZAKI, G.; UEMURA, M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. Microbiology and Immunology. Tokyo, v. 51, n. 12, p. 1139-47, 2007.

MATTNER F. *et al.* Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with Leishmania major and mount a polarized Th2 cell response. European Journal of Immunology, Weinheim, v. 26, p. 1553-1559, 1996.

MENDEZ, S. *et al.* Role for CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Reactivation of Persistent Leishmaniasis and Control of Concomitant Immunity. Journal of Experimental Medicine, New York, v. 200, n. 2, p. 201-210, 2004.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 428 p.

NOVOA, R. *et al.* IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in L. braziliensis Infection. Parasite Immunology, Oxford, v.33, n.2, p.132-136, 2011.

O'GARRA, A. *et al.* IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. Journal of Clinical Investigation, Michigan, v. 114, n. 10, p. 1372-1378, 2004.

OLIVEIRA, A.P. *et al.* Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary Leishmaniasis by anti-live Leishmania (Viannia) braziliensis immunoglobulin G. Journal of immunological methods, Amsterdam, v.387, n.1-2, p.245-253, 2013

OLIVEIRA, A. P. Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

OUKKA, M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. Annals of the Rheumatic Diseases, London, v. 66, p. 87-90, 2007.

PERES, A.; NARDI, N. B.; CHIE, J. A. B. Imunossenescência: O envolvimento das células T no envelhecimento. Biociências, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 187-194, 2003.

PINHEIRO, P. H. C. *et al.* Recombinant Cysteine Proteinase from *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* Implicated in Human and Dog T-Cell Responses. Infection and Immunity, Washington, v. 73, n. 6, p. 3787–3789, 2005.

PITTA, M.G.R. *et al.* IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. Journal of clinical investigation, Nova Iorque, v. 119, p. 2379–87, 2009.

REIS, L. C. *et al.* Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. Revista de Patologia Tropical, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.

REIS, L. C. *et al.* Cellular Immune Response Profile in Patients With American Tegumentary Leishmaniasis Prior and Post Chemotherapy Treatment. Journal of Clinical Laboratory Analysis, New York, v. 23, p. 63–69, 2009.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis. The Lancet Infectious Diseases, New York, v. 7, p. 581-596, 2007.

ROCHA, J. S. F. *et al.* Cytokines, Signaling Pathways, and Effector Molecules Required for the Control of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Mice. Infection and Immunity, Washington, v. 75, n.8, p. 3823–3832, 2007.

ROGERS K. A. *et al.* Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 209, p. 1-7, 2002.

ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. Elementos de epidemiologia epidemiológica. In:\_\_\_\_\_. Epidemiologia & Saúde. 6. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003, p. 149-177.

RUTITZKY, L.I.; LOPES DA ROSA, J.R.; STADECKER M.J. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. Journal of Immunology, Baltimore, v. 175, p. 3920–3906, 2005.

SAKAGUCHI S. *et al.* Regulatory T Cells and Immune Tolerance. Cell, Cambridge, v. 133, p. 775-87, 2008.

SANTOS, D. O. *et al.* Leishmaniasis treatment- a challenge that remains: a review. Parasitology Research, Berlin, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2008.

SCHMIDT-WEBER, C. B.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Th17 cells in the big picture of immunology. Journal of Allergy and Clinical Immunology, St. Louis, v. 120, n. 2, p. 247-254, 2007.

SCHNYDER B., LIMA C., SCHNYDER-CANDRIAN S. Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response. Cytokine, San Diego, v. 50, n. 2, p. 220-7, 2010.

SCOTT P., FARREL J. P. Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Induction and Regulation of T Cells following Infection of Mice with *Leishmania major*. Chemical Immunology, Basel, v. 70, p. 60-80, 1998.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SOUZA, M. A. *et al.* Immunity against Leishmaniasis. Leishmaniasis: Symptoms, Treatment and Potential Complications. 1ed. E-book: Nova Publisher, 2013. No prelo.

SOUZA, W. J. S. *et al.* Utilização da reação de imunofluorescência indireta no acompanhamento da terapêutica da Leishmaniose Tegumentar Americana. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 247-253, 1982.

SOUZA, M. A. Avaliação da produção in vitro de citocinas e de óxido nítrico na leishmaniose tegumentar ativa e após a cura clínica. Dissertação (Mestrado). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, 2009.

SOUZA, M. A. *et al.* American Tegumentary Leishmaniasis: Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Clinical Cure, With or Without Chemotherapy. Scandinavian Journal of Immunology, Oslo, v 76, p. 175–180, 2012.

STOCKINGER B., VELDHOEN M. Differentiation and function of Th17 cells. Current Opinion in Immunology, London, v. 19, p. 281-286, 2007.

## APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Grupo Paciente



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



**AGGEU MAGALHÃES**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente -

Projeto: “Avaliação da produção de citocinas na resposta imune celular de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após a cura clínica”.

O objetivo principal do referido projeto é a investigação da resposta imunológica (defesa do organismo da pessoa) dos pacientes com leishmaniose tegumentar ativa, após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico e dos pacientes que não se curam com o tratamento.

O senhor está sendo convidado a participar deste estudo por se encontrar no grupo de pacientes. Esse grupo será submetido a coleta de sangue venoso em volume equivalente a quatro colheres de sopa antes e após tratamento quimioterápico ou após cura clínica espontânea e a exames que incluirão a intradermoreação de Montenegro, pesquisa direta; punção aspirativa, biópsia da borda da lesão ativa, imunofluorescência indireta e PCR. Todas as informações e os detalhes dos exames que serão realizados serão previamente esclarecidos para o senhor. Além disso, também o senhor será informado que receberá os resultados desses exames. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. O senhor será informado que a coleta de sangue é um método invasivo, por isso pode causar desconforto no local, na hora da picada e que não devo friccionar (movimento com força) o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. O esquema terapêutico com Glucantime® (remédio utilizado para o tratamento) será composto por doses de 20 mg/Kg/dia através de injeções intramusculares em ciclos de vinte a trinta dias, sendo realizado no posto de saúde do município de Moreno por funcionários qualificados (médicos, enfermeiros ou auxiliares de enfermagem). Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração em seu organismo, o senhor deverá procurar o médico do posto de saúde. Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema de defesa do organismo participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. Antes de sua participação no referido projeto, o senhor será incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgue necessário, esclarecida por um participante do projeto. O senhor está ciente que poderá recusar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo. A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O CPqAM/FIOCRUZ também poderá estocar amostra biológica para posteriores estudos. O senhor será informado que para usar a amostra

biológica estocada, um pesquisador do projeto entrará em contato com o senhor. Caso seja necessário, o senhor pode contactar o CEP/CPqAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

O senhor está ciente que caso sofra qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, o senhor terá direito à indenização. O pesquisador, o patrocinador e a instituição devem assumir a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos. O senhor também está ciente das formas e previsão de ressarcimento de suas despesas, decorrentes de sua participação na pesquisa.

O senhor está ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter sobre o significado dos termos empregados no presente texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

Eu,.....(identidad e:.....), li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ)

---

Endereço do paciente para contato

data

---

Assinatura do paciente

data

---

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

data

Endereço profissional: Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil.

Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.

## **APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Grupo Paciente Menor de 18 anos**



Centro de Pesquisas

**Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde**



**AGGEU MAGALHÃES**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente menor de 18 anos

Projeto: “Avaliação da produção de citocinas na resposta imune celular de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após a cura clínica”.

O objetivo principal do referido projeto é a investigação da resposta imunológica (defesa do organismo da pessoa) dos pacientes com leishmaniose tegumentar ativa, após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico e dos pacientes que não se curam com o tratamento.

Como responsável pelo menor, o senhor está sendo convidado a participar deste estudo por se encontrar no grupo de pacientes menor de 18 anos. Esse grupo será submetido a coleta de sangue venoso em volume equivalente a quatro colheres de sopa antes e após tratamento quimioterápico ou após cura clínica espontânea e a exames que incluirão a intradermoreação de Montenegro, pesquisa direta; punção aspirativa, biópsia da borda da lesão ativa, imunofluorescência indireta e PCR. Todas as informações e os detalhes dos exames que serão realizados serão previamente esclarecidos para o senhor que é responsável pelo menor. Além disso, também o senhor será informado que receberá os resultados desses exames. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. O senhor como responsável pelo menor será informado que a coleta de sangue é um método invasivo, por isso pode causar desconforto no local, na hora da picada e que não devo friccionar (movimento com força) o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. O esquema terapêutico com Glucantime® (remédio utilizado para o tratamento) será composto por doses de 20 mg/Kg/dia através de injeções intramusculares em ciclos de vinte a trinta dias, sendo realizado no posto de saúde do município de Moreno por funcionários qualificados (médicos, enfermeiros ou auxiliares de enfermagem). Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração no organismo do menor, o senhor que é responsável pelo menor deverá procurar o médico do posto de saúde. Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema de defesa do organismo participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. Antes de sua participação no referido projeto, o senhor será incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgue necessário, esclarecida por um participante do projeto. O senhor está ciente que poderá recusar ou retirar o consentimento do menor em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo. A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) está

autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a identidade do menor. O CPqAM/FIOCRUZ também poderá estocar amostra biológica para posteriores estudos. O senhor será informado que para usar a amostra biológica estocada do menor, um pesquisador do projeto entrará em contato com o senhor. Caso seja necessário, o senhor pode contactar o CEP/CPqAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

O senhor está ciente que caso o menor sofra qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, o senhor como responsável pelo menor terá direito à indenização. O pesquisador, o patrocinador e a instituição devem assumir a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos. O senhor também está ciente das formas e previsão de ressarcimento de suas despesas, decorrentes de sua participação na pesquisa.

O senhor como responsável pelo menor está ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter sobre o significado dos termos empregados no presente texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assinasse este impresso.

Eu,.....,  
(identidade:.....), responsável pelo menor  
....., li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ)

\_\_\_\_\_

Endereço do responsável pelo menor

\_\_\_\_\_

data

\_\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo menor

\_\_\_\_\_

data

\_\_\_\_\_

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

\_\_\_\_\_

data

Endereço profissional: Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil.

Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.



## APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Grupo Controle



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



**AGGEU MAGALHÃES**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle –

Projeto: “Avaliação da produção de citocinas na resposta imune celular de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após a cura clínica”.

O objetivo principal do referido projeto é a investigação da resposta imunológica (defesa do organismo da pessoa) dos pacientes com leishmaniose tegumentar ativa, após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico e dos pacientes que não se curam com o tratamento.

O senhor está sendo convidado a participar deste estudo por se encontrar no grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos que não apresentam a doença e que servirão de comparação com os indivíduos doentes. O senhor será submetido a uma única coleta de sangue venoso em volume equivalente a quatro colheres de sopa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. O senhor será informado que a coleta de sangue é um método invasivo, por isso pode causar desconforto no local, na hora da picada e que não devo friccionar (movimento com força) o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema de defesa do organismo participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Como o senhor faz parte do grupo controle não será submetido a nenhum tratamento com Glucantime® (remédio utilizado no tratamento da leishmaniose tegumentar americana). Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Antes de sua participação no referido projeto, o senhor será incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgue necessário, esclarecido por um participante do projeto, sobretudo em relação a importância do grupo controle. Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema de defesa do organismo participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

O senhor está ciente que poderá recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo. A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O CPqAM/FIOCRUZ também poderá estocar amostra biológica

para posteriores estudos. O senhor será informado que para usar a amostra biológica estocada, um pesquisador do projeto entrará em contato com o senhor. Caso seja necessário, o senhor pode contactar o CEP/CPqAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

O senhor está ciente que caso sofra qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, o senhor terá direito à indenização. O pesquisador, o patrocinador e a instituição devem assumir a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos. O senhor também está ciente das formas e previsão de ressarcimento de suas despesas, decorrentes de sua participação na pesquisa.

O senhor está ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter sobre o significado dos termos empregados no presente texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

Eu,.....(identidade e:.....), li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ)

\_\_\_\_\_

Endereço do voluntário

\_\_\_\_\_

data

\_\_\_\_\_

Assinatura do do voluntário

\_\_\_\_\_

data

\_\_\_\_\_

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

\_\_\_\_\_

data

Endereço profissional: Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil.  
Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>

\_\_\_\_\_

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil. Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.

## ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética da Instituição



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
Presidência

**Rio de Janeiro, 17 de dezembro de 2009**

Declaro para os devidos fins que do projeto de Cooperação Internacional intitulado "Estudo do papel de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> na Leishmaniose Tegumentar Americana" foi aprovado no Convênio Bilateral INSERM/FIOCRUZ, para o biênio 2010-2011. O projeto é coordenado no Brasil por Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira (Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ/PE) e na França por Dr. Alain Dessein (Laboratório de Imunologia e Genética de Doenças Parasitárias/ INSERM).

**Norma Brandão**  
**CRIS - FIOCRUZ**

**Centro de Relações Internacionais em Saúde**

**Norma Brandão**  
Assessora  
Centro de Relações Internacionais em Saúde  
Presidência / Fiocruz - Mat. 1362306-1