

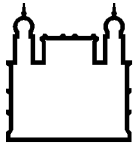
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação *Strictu Senso* em Biologia Parasitária

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B E  
FUNCIONALIDADE DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA *LEISHMANIA* EM  
PACIENTES CURADOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

**SAMYRA ALMEIDA DA SILVEIRA**

Rio de Janeiro  
Março de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação *Strictu Senso* em Biologia Parasitária**

***SAMYRA ALMEIDA DA SILVEIRA***

Caracterização de subpopulações de linfócitos B e funcionalidade de anticorpos específicos para *Leishmania* em pacientes curados de leishmaniose cutânea

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Orientadora:** Prof. Dra. Alda Maria da Cruz

**RIO DE JANEIRO**

Março de 2017

Silveira, Samyra Almeida da.

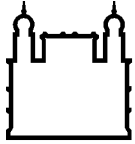
Caracterização de subpopulações de linfócitos B e funcionalidade de anticorpos específicos para *Leishmania* em pacientes curados de leishmaniose cutânea / Samyra Almeida da Silveira. - Rio de Janeiro, 2017. 73 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientadora: Alda Maria da Cruz.

Bibliografia: f. 63-73

1. linfócitos B. 2. anticorpos. 3. leishmaniose cutânea. I. Título.



Ministério da Saúde

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

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Biologia Parasitária**

***AUTOR: SAMYRA ALMEIDA DA SILVEIRA***

### **CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B E FUNCIONALIDADE DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA *LEISHMANIA* EM PACIENTES CURADOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

**ORIENTADORA: Prof. Dr. Alda Maria da Cruz**

**Aprovada em: 19/04/17**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior - *Presidente* (IOC/Fiocruz)**

**Prof. Dr. Renato Porrozzi de Almeida (IOC/Fiocruz)**

**Prof. Dr. Lucimar Gonçalves Milagres (UERJ-RJ)**

**Prof. Dr. Andrea Henriques Pons – *Suplente* (IOC/Fiocruz)**

**Prof. Dr. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva - *Suplente* (UERJ-RJ)**

Rio de Janeiro, 29 de março de 2017

À minha mãe, Sueli, e minha irmã,  
Silvia, meus maiores exemplo e  
inspiração.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me conduzir a lugares muito maiores que meus sonhos e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais.

À minha família, minha mãe Sueli, minha irmã Silvia, meu cunhado Junior, meu irmão Ademir e meu padrasto Waldir, pelo apoio incondicional, por compreenderem as ausências e por serem, em muitos momentos, a força que me fez prosseguir.

À minha orientadora, Alda Maria da Cruz, por me receber gentilmente no laboratório, por me conceder essa incrível oportunidade e por sua rica contribuição à minha formação.

Ao meu orientador, Adriano Gomes da Silva, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho, por sua incansável dedicação e por estar sempre disponível, independente de hora, final de semana, feriado ou férias. Por toda atenção e paciência ao explicar até mesmo as coisas mais simples, sempre repetindo quantas vezes fossem necessárias. Por toda exigência e detalhismo que só me fizeram crescer e aprimorar meu trabalho. Por confiar e acreditar em mim quando nem mesmo eu acreditava. Por ser meu maior exemplo de pesquisador e por me conceder a honra de trabalhar ao seu lado e aprender cada dia mais.

Ao Dr. Ricardo Vieira Gonçalves, responsável pelo recrutamento dos voluntários participantes deste estudo, bem como pela coleta de dados clínicos e material biológico destes.

À Giselle, de que sempre me considerarei pupila, por ter estado pacientemente do meu lado durante meus primeiros passos no laboratório e por ter me dado o prazer de ser sua companheira de trabalho por um curto, mas muito proveitoso período.

À Rosa por toda sua dedicação e capricho em manter a organização do laboratório e assim proporcionar toda a estrutura necessária para a realização dos experimentos. Por ser um grande exemplo de profissional e por toda disponibilidade em ensinar sempre.

À Joanna, por ter dedicado seu tempo na contribuição da escrita desta dissertação com muito carinho e preocupação.

Aos meus amigos/irmãos, Clébio e Guilherme, por toda ajuda nos experimentos e na composição deste trabalho e por me alegrarem até mesmo nos dias mais tristes.

À Sabrina, presente que ganhei nessa jornada, por estar sempre do meu lado me alegrando e me encorajando. Seu sorriso me manteve de pé durante vários momentos. Obrigada também pela ajuda na composição deste trabalho.

À Marcelle, que começou comigo essa jornada e esteve do meu lado em todo tempo, me apoiando e me dando forças para continuar. Obrigada por ter sempre uma palavra de conforto e por me fazer acreditar que eu conseguiria terminar.

À Luciana, a pessoa que vivenciou comigo todos os momentos mais difíceis deste processo e também dividiu comigo a alegria de cada pequena vitória. Obrigada pela ajuda no projeto Report e por se desdobrar em mil para ainda assim me ajudar na escrita, na execução de experimentos, na confecção de gráficos, na montagem das apresentações, dentre diversas outras coisas. Obrigada por todas as orientações, dicas, conselhos, broncas e por sempre ter uma palavra de conforto.

A todos os amigos do Lipmed, em especial à Raquel, Milene, Maria, Luzinei, Joanna, Phelipe, Tiara, Lila, Pâmela, Fernanda, Eduardo, além dos já citados anteriormente, por me receberam de braços abertos quando cheguei ao laboratório de modo a me fazer sentir como parte integrante deste grupo desde o início e por estarem sempre dispostos a ajudar, tirar dúvidas, dar dicas, conselhos e compartilhar seus conhecimentos comigo. Tenho muito orgulho de trabalhar com amigos tão especiais cuja companhia torna a rotina divertida e agradável e alunos/profissionais que me inspiram a cada dia.

À Claudinha, por ter cuidado de mim durante esse período como se eu fosse sua filha.

Ao funcionário da jardinagem que, mesmo sem me conhecer, me recebeu diversas vezes com um animado e contagiante “bom dia” e uma palavra de ânimo para continuar esta jornada.

Aos meus queridos amigos do Hospital Federal de Bonsucesso, minha família SNB, Adriana, Sheila, Eduardo, Alexandre, Roberto, Ana, Edna e Ângela, por todo apoio e compreensão, por entender meu cansaço e as vezes que precisei chegar mais tarde ou sair mais cedo. Por se preocuparem e cuidarem de mim como sua caçulinha. Em especial à Ana por seu maravilhoso café, combustível para as madrugadas de estudo e força para mais doze horas de trabalho. Aos amigos Isac, Cilene, Felipe, Maria Lúcia, e Julieta, por ouvirem minhas lamentações e sempre me darem força pra continuar.

Às minhas queridas palitas, Paloma, Cíntia, Ana e Natália, companheiras de trabalho e amigas para a vida toda, por todo apoio e incentivo.

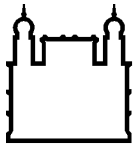
Às minhas grandes amigas Débora e Wanessa por todo apoio, por chorarem comigo nos momentos difíceis, por se alegrarem com minhas vitórias e por estarem sempre presentes, independente da distância.

Aos membros da banca examinadora, por suas ricas contribuições a este trabalho. Em especial ao Dr. Josué da Costa Lima Junior, pela revisão desta dissertação.



Se nada mudar, invente.  
E quando mudar, entenda.  
Se ficar difícil, enfrente.  
E quando ficar fácil, agradeça.  
Se a tristeza rondar, alegre-se.  
E quando ficar alegre, contagie.  
Se o caminho for longo, persista.  
E quando chegar, comemore.  
Se achar que acabou, recomece.  
E quando recomeçar, acredite.  
Se você acreditar, você tudo pode.

Nicholas Montessore



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

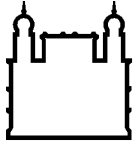
### CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B E FUNCIONALIDADE DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA *LEISHMANIA* EM PACIENTES CURADOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Samyra Almeida da Silveira

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que os títulos séricos de IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* tendem a decair após a cura clínica da leishmaniose cutânea (LC). Entretanto, há indivíduos que mantêm títulos elevados, mesmo longo tempo após a cura. Nossa hipótese é que o perfil de subpopulações de linfócitos B que permanece após cura clínica difere entre grupos com sorologia positiva e negativa, e que essas células podem secretar anticorpos e produzir citocinas que modulam negativamente a resposta imune celular, podendo favorecer a persistência parasitária. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar se linfócitos B e anticorpos secretados desempenham um papel modulador da resposta imune celular na infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em indivíduos curados longo tempo após o tratamento. Os voluntários foram agrupados de acordo com a positividade plasmática de IgG, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* como positivos (Ig+, n=17) e negativos (Ig-, n=16), além de um grupo controle (n=19). As células mononucleares de sangue periférico (PBMC), previamente criopreservadas, foram descongeladas e colocadas em cultura por cinco dias na ausência de estímulo ou na presença de antígenos de *L. braziliensis* (Lb-Ag) ou *Toxoplasma gondii*. A concentração de IgG1 ou IgG3 no sobrenadante de cultura foi quantificada por ELISA. Independente do resultado sorológico, 20% (6/30) dos indivíduos apresentaram níveis de IgG1 acima do valor de corte, para as culturas estimuladas com Lb-Ag e para as não estimuladas, enquanto que, para IgG3, foram 90% (27/30) para as culturas não estimuladas e 53% (16/30) para as estimuladas com Lb-Ag. Entretanto, essas concentrações de anticorpos não apresentaram correlação com os títulos das amostras de soro dos mesmos indivíduos. O perfil de subpopulações de linfócitos B (*naïve*, memória inicial, memória e plasmócitos) foi investigado por citometria de fluxo e não foi significativamente diferente entre os grupos Ig+ e Ig-, e entre os indivíduos curados e o grupo controle. A influência de anticorpos opsonizantes na atividade anti-*Leishmania* de macrófagos foi avaliada através da infecção de macrófagos por promastigotas de *L. braziliensis* que foram incubadas com soro de indivíduos Ig+ e Ig-. Não foi observada diferença estatística entre os grupos Ig+ e Ig- em relação à taxa e índice de infecção, produção de citocinas inflamatórias e produção de nitrito. Em suma, os indivíduos curados de LC Ig+ e Ig- são semelhantes entre si, no que diz respeito às subpopulações de linfócitos B de sangue periférico, e em relação à influência de anticorpos opsonizantes na atividade anti-*Leishmania* de macrófagos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### CHARACTERIZATION OF B LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS AND *LEISHMANIA* SPECIFIC ANTIBODIES FUNCTIONALITY IN HEALED CUTANEOUS LEISHMANIASIS PATIENTS

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION/PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Samyra Almeida da Silveira

Previous studies of our group demonstrated that serum anti-*Leishmania* IgG1 and IgG3 titles tend to decay after cutaneous leishmaniasis clinical cure (CCL). Besides this fact some CCL subjects keep high titers of specific antibodies, even after long time of cure. Our hypothesis says that circulating B lymphocytes profile, which remain after clinical cure, are different among groups with positive and negative serology and that these cells can secrete antibodies that can lead to a negative modulation of cell immune response and also may favor parasitic persistence. The objective of this study was to investigate whether B lymphocytes and secreted antibodies play a role in modulating the cellular immune response in *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection on subjects who were declared cured after a long time of treatment. Volunteers were distributed into CCL positive group (Ig+, n=17), CCL negative group (Ig-, n=16) according to IgG, IgG1 and IgG3 anti-*Leishmania* plasmatic titre, and a control group (Control, n=19). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) previously frozen were then thawed and kept in culture during five days in the absence of stimulus or in the presence of *L. braziliensis* (Lb-Ag) or *Toxoplasma gondii* antigens. The concentration of IgG1 and IgG3 on culture supernatants was quantified by ELISA. Regardless of serologic results, 20% (6/30) of individuals showed IgG1 levels above cut off, for stimulated cultures with Lb-Ag and for not stimulated cultures, whereas for IgG3 it was 90% (27/30) for not stimulated cultures and 53% (16/30) for stimulated cultures with Lb-Ag. However, this antibodies concentration showed no correlation with the titers observed in the serum samples from the same individuals. B lymphocytes subsets profiles (naïve, early memory, memory and plasma cells) was investigated through flow cytometry and was not significantly different among Ig+ and Ig- groups, and among CCL and control group. The opsonized antibodies influence in the anti-*Leishmania* macrophage activity was evaluated through the infection of macrophages with *L. braziliensis* promastigotes that were incubated with serum of Ig+ and Ig- CCL individuals. It was not observed difference among Ig+ and Ig- groups with respect to infection tax, infection index, inflammatory cytokine production, and nitrite production. This suggests that opsonizing antibodies seems not to influence anti-*Leishmania* macrophage activity. In summary, the CCL Ig+ and CCL Ig- individuals are similar about B lymphocyte phenotype, and similar too with respect to the influence of opsonizing antibodies on the macrophages' anti-*Leishmania* activity.

## ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia das leishmanioses .....	1
1.2 A leishmaniose tegumentar Americana .....	2
1.3 Imunopatogênese da leishmaniose tegumentar Americana ativa .....	4
1.4 Resposta imune no processo de cura da leishmaniose tegumentar Americana.....	8
1.5 O papel de linfócitos B na infecção por <i>Leishmania</i> .....	11
1.6 O papel dos anticorpos na infecção por <i>Leishmania</i> .....	14
1.7 Justificativa.....	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos .....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Casuística e aspectos éticos.....	18
3.2 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico e plasma.....	18
3.3 Cultivo de formas promastigotas e preparação de antígeno total de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	19
3.4 Quantificação de IgG1 e IgG3 anti- <i>Leishmania</i> em sobrenadante de cultura de Células Mononucleares de Sangue Periférico.....	21
3.5 Cultivo de células mononucleares de sangue periférico e imunofenotipagem de linfócitos B por citometria de fluxo .....	22
3.5.1 Determinação da viabilidade celular .....	23
3.5.2 Estratégia de análise das subpopulações de linfócitos B .....	23
3.6 Ensaios de interação entre macrófagos e <i>Leishmania (Viannia)</i> <i>braziliensis</i> opsonizada com anticorpos.....	25

3.6.1	Cultivo de formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	25
3.6.2	Diferenciação de monócitos de linhagem THP-1 em macrófagos .....	25
3.6.3	Interação entre macrófagos e <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> opsonizada .....	26
3.6.4	Controle de opsonização por Imunofluorescência .....	26
3.6.5	Coloração das lamínulas e montagem das lâminas .....	26
3.6.6	Determinação da taxa e do índice de infecção dos macrófagos .....	27
3.6.7	Quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos .....	27
3.6.8	Quantificação de nitrito em sobrenadante de cultura dos macrófagos .....	29
<b>3.7</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Produção de IgG1 e IgG3 por plasmócitos de sangue circulante.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Perfil fenotípico de subpopulações de linfócitos B no sangue periférico de pacientes curados de leishmaniose cutânea .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Influência de anticorpos opsonizantes na atividade anti-<i>Leishmania</i> de macrófagos .....</b>	<b>44</b>
4.3.1	Controle de opsonização de formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> por anticorpos presentes no soro de indivíduo curado de leishmaniose cutânea por imunofluorescência.....	44
4.3.2	Taxa e índice de infecção por promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea em macrófagos.....	47
4.3.3	Quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea .....	48
4.3.4	Quantificação de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com promastigotas de <i>Leishmania</i>	

	(Viannia) braziliensis expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea .....	50
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição geográfica dos casos de leishmaniose cutânea no mundo.	<b>1</b>
<b>Figura 2:</b> Ciclo biológico de <i>Leishmania sp.</i>	<b>3</b>
<b>Figura 3:</b> Estratégia de análise das diferentes subpopulações de linfócitos B por citometria de fluxo multiparamétrica.	<b>24</b>
<b>Figura 4:</b> Imagens de microscopia de luz de células THP-1 utilizadas para determinação de taxa e do índice de infecção por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .	<b>28</b>
<b>Figura 5:</b> Quantificação de imunoglobulina (Ig)G1 e IgG3 secretadas por plasmócitos circulantes estimulados por antígenos de <i>Leishmania</i> .	<b>31</b>
<b>Figura 6:</b> Análise da viabilidade celular de células mononucleares de sangue periférico após o descongelamento.	<b>32</b>
<b>Figura 7:</b> Perfil de linfócitos B CD19 <sup>+</sup> em pacientes curados de leishmaniose cutânea.	<b>34</b>
<b>Figura 8:</b> Perfil de linfócitos B CD20 <sup>+</sup> em pacientes curados de leishmaniose cutânea.	<b>36</b>
<b>Figura 9:</b> Perfil de linfócitos B <i>naive</i> em pacientes curados de leishmaniose cutânea.	<b>38</b>
<b>Figura 10:</b> Perfil de linfócitos B de memória inicial em pacientes curados de leishmaniose cutânea.	<b>40</b>
<b>Figura 11:</b> Perfil de linfócitos B de memória em pacientes curados de leishmaniose cutânea.	<b>42</b>
<b>Figura 12:</b> Perfil de plasmócitos em pacientes curados de leishmaniose cutânea.	<b>43</b>
<b>Figura 13:</b> Imunofluorescência para controle de opsonização de formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> por anticorpos presentes no soro de indivíduo curado de leishmaniose cutânea.	<b>45</b>
<b>Figura 14:</b> Imunofluorescência para controle de opsonização de formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> por anticorpos presentes no soro de indivíduo sem histórico de leishmaniose cutânea.	<b>46</b>
<b>Figura 15:</b> Taxa e índice de infecção por promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea em macrófagos.	<b>48</b>

**Figura 16:** Níveis de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea. **49**

**Figura 19:** Níveis de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea. **50**



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Voluntários do estudo sem histórico de leishmaniose cutânea: ensaios laboratoriais.	<b>19</b>
<b>Tabela 2:</b> Perfil de voluntários curados de leishmaniose cutânea: clínica, terapêutica e ensaios laboratoriais.	<b>20</b>
<b>Tabela 3:</b> Fenótipo/função de linfócitos B e seus marcadores.	<b>22</b>
<b>Tabela 4:</b> Porcentagem das subpopulações de linfócitos B em sangue periférico de indivíduos curados de leishmaniose cutânea.	<b>44</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>APC-Cy7</b>	Do inglês, allophycocyanin cyanine 7
<b>Be</b>	Célula B efetora
<b>Breg</b>	Célula B regulatória
<b>BSA</b>	Do inglês, bovine sérum albumin
<b>CLA</b>	Do inglês, antígeno cutâneo leucocitário
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ELISA</b>	Do inglês, Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>ELISPOT</b>	Do inglês, Enzyme Linked ImmunoSpot Assay
<b>FITC</b>	Do inglês, Isotiocianato de fluoresceína
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>IDRM</b>	Intradermoreação de Montenegro
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Do inglês, Interferon gama
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LC</b>	Leishmaniose cutânea
<b>LCD</b>	Leishmaniose cutânea difusa
<b>LM</b>	Leishmaniose mucosa
<b>LTA</b>	Leishmaniose tegumentar Americana
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPD</b>	Do inglês, o-phenylenediamine dihydrochloride
<b>PE</b>	Do inglês, R-phycoerythrin
<b>PE-Cy7</b>	Do inglês, R-phycoerythrin cyanine 7
<b>PercP</b>	Do inglês, Peridina-clorofila
<b>PAMP</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>PMA</b>	12-miristato 13-acetato de forbol
<b>PBMC</b>	Do inglês, Células mononucleares de sangue periférico
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>Sb<sup>+5</sup></b>	Antimonial pentavalente
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Do inglês, transforming growth factor
<b>Th</b>	Célula T <i>helper</i>
<b>TNF</b>	Do inglês, fator de necrose tumoral
<b>Treg</b>	Célula T regulatória

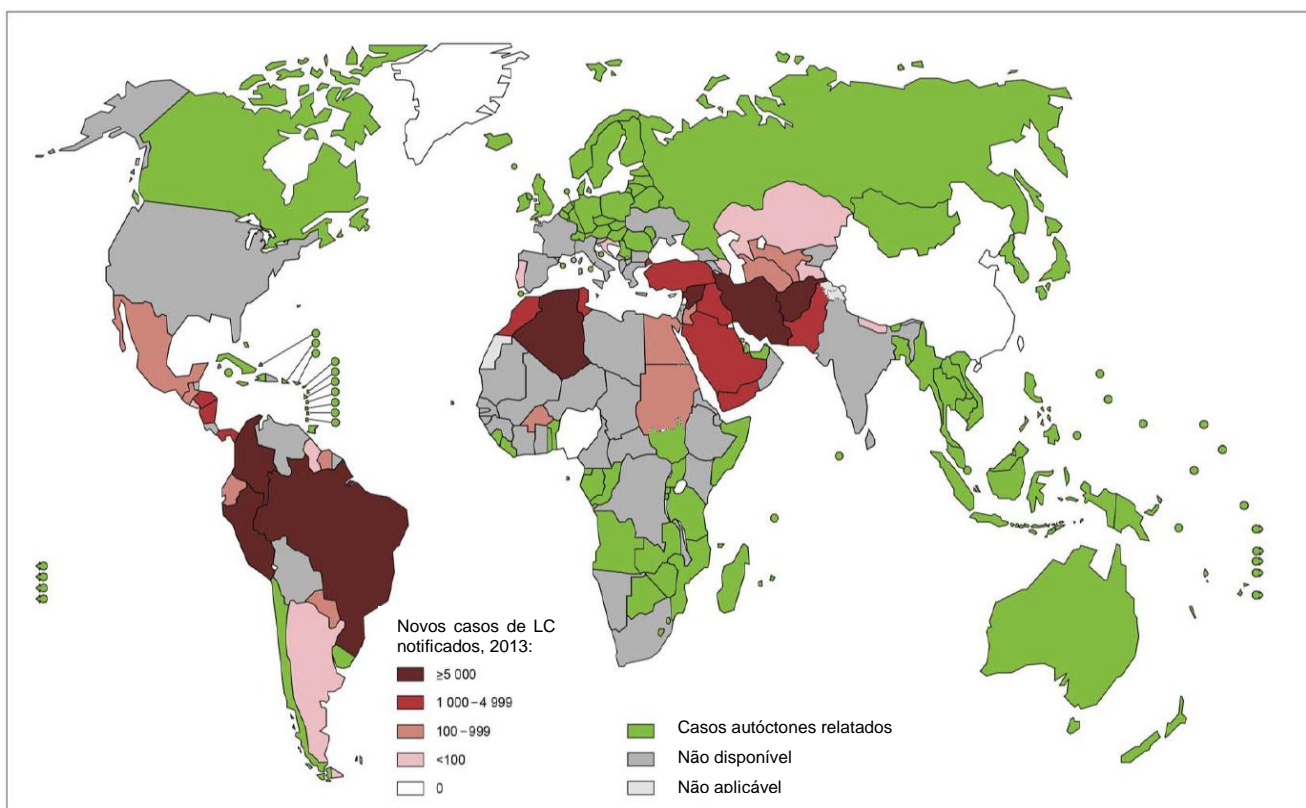


# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão presentes em 102 países. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorre em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. A maioria dos casos de leishmaniose cutânea (70%) se concentra em dez países: Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Iran, Peru, Sudão e República Árabe da Síria (WHO, 2014).

No Brasil, a doença é classificada como endêmica e apresenta registros de cerca de 20.000 casos por ano, estando amplamente distribuída pelo território nacional, porém concentrando-se principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país (WHO, 2015).



**Figura1: Distribuição geográfica dos casos de leishmaniose cutânea no mundo.** Adaptado de WHO, 2015.

## 1.2 A leishmaniose tegumentar Americana

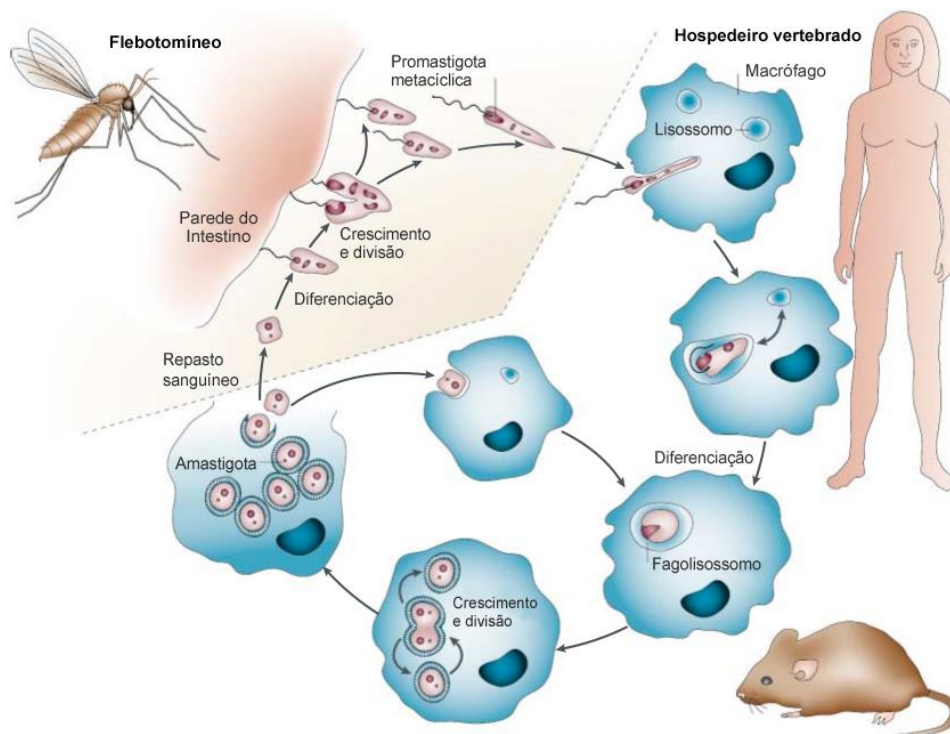
A leishmaniose tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que podem ser transmitidas por diferentes espécies de insetos flebotomíneos. Dependendo da espécie envolvida e da resposta imunológica do hospedeiro, a doença pode evoluir clinicamente de maneiras diferentes, podendo ter um acometimento cutâneo, caracterizando a leishmaniose cutânea (LC), ou gerar danos no tecido da mucosa oral e nasal, o que ocorre na leishmaniose mucosa (LM). Essas duas formas de apresentação clínica são as principais, entretanto, existe também a forma difusa da doença, conhecida por leishmaniose cutânea-difusa (LCD), caracterizada por lesões múltiplas não ulceradas com presença de grande número de parasitos e uma resposta imune celular baixa ou inexistente.

Os protozoários causadores da LTA consistem em parasitos intracelulares obrigatórios que apresentam duas formas evolutivas: as amastigotas, que possuem forma arredondada e flagelo interiorizado, e as promastigotas, que são estruturas alongadas que apresentam flagelo livre (Rey, 2001). O ciclo biológico do protozoário inicia-se quando fêmeas de flebotomos ingerem formas amastigotas de *Leishmania* de um hospedeiro vertebrado infectado durante o repasto sanguíneo. No interior do tubo digestivo do inseto vetor, os parasitos passam por um processo denominado metaciclogênese, transformando-se em formas promastigotas metacíclicas, que migram para as glândulas salivares do hospedeiro invertebrado, o que permite que estas sejam transmitidas a outro hospedeiro na ocasião de um novo repasto sanguíneo. Após a inoculação das promastigotas infectivas no hospedeiro vertebrado, estas são fagocitadas por células fagocíticas, no interior destas transformam-se em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária, caracterizando assim a infecção (figura 2).

No Brasil já foram identificadas sete espécies do gênero *Leishmania* capazes de causar a doença, sendo que as principais são *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*. Os vetores que transmitem essas espécies pertencem ao gênero *Lutzomyia* e são popularmente conhecidos como mosquito palha (Rey, 2001).

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde para a LTA é a aplicação intravenosa ou intramuscular de antimonial pentavalente ( $Sb^{+5}$ ). A dose sugerida é de 15 mg  $Sb^{+5}$ /kg/dia durante 20 dias consecutivos, para o tratamento de lesões

cutâneas, e de 20 mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia durante 30 dias consecutivos, para o tratamento de lesões mucosas. Caso não ocorra a cicatrização, o esquema terapêutico deve ser repetido, e se novamente não for eficaz, a terapia deve prosseguir com as drogas de segunda escolha, que são a anfotericina B e a pentamidina (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina). Apesar do tratamento de primeira escolha mostrar-se eficaz na maioria dos casos, o antimonial apresenta alta toxicidade, podendo ocasionar alterações cardíacas, pancreáticas ou renais que obriguem a descontinuação do tratamento (Brasil, 2013).



**Figura 2: Ciclo biológico de *Leishmania* sp.** Adaptado de Sacks & Noben-Trauth, 2002.

O critério de cura na LTA é clínico, sendo definido, no caso da LC, pela reconstituição do epitélio lesionado, com regressão total da infiltração e eritema, observados até três meses após a conclusão do esquema terapêutico. Este processo ocorre em consequência da redução gradativa da presença e ação de células inflamatórias, seguida do remodelamento do tecido danificado (Morgado et al. 2010, Brasil 2013). Entretanto, a persistência parasitária tem sido observada, até mesmo anos após a cicatrização (Schubach et al. 1998, Mendonça et al. 2004). A cura das lesões mucosas tem sido determinada pelo critério clínico em combinação com exames otorrinolaringológicos (Nonata et al. 1997, Amato et al. 2000, Boaventura et al. 2009).

### 1.3 Imunopatogênese da leishmaniose tegumentar Americana ativa

Em uma infecção por formas promastigotas de *Leishmania*, os momentos iniciais são de fundamental importância para a indução de estímulos necessários na obtenção de uma resposta imune capaz de conter a replicação do parasito. Em poucas horas após a infecção ocorrem interações entre moléculas presentes na superfície do parasito, os chamados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), com receptores específicos localizados na superfície de células do sistema imune inato, como células dendríticas e macrófagos (Veer et al. 2003, Tuon et al. 2008). Essas interações iniciais fornecerão estímulos para ativar a produção de citocinas que auxiliarão no processo de ativação das células do sistema imune adaptativo, como os linfócitos T e os linfócitos B.

Após a inoculação do parasito pelo vetor, o sistema imune da pele induz o recrutamento de células inflamatórias e a ativação da resposta imune adaptativa. Dentre as células que participam das respostas iniciais na infecção por *Leishmania* estão os neutrófilos, apresentando importante capacidade de fagocitose e destruição de formas parasitárias (Novais et al. 2009). Entretanto, mecanismos de evasão dependente dos neutrófilos também podem contribuir para a perpetuação do parasito, uma vez que a fagocitose dessas células infectadas impede a ativação dos macrófagos, possibilitando a entrada silenciosa dos parasitos nos macrófagos e a sua persistência nestas células (Laskay et al. 2003, Peters 2008, Ritter et al. 2009). Os macrófagos representam a célula hospedeira preferencial na infecção por *Leishmania*, mas também atuam como principal célula efetora na destruição do parasito e apresentação de antígeno aos linfócitos T.

Uma mesma espécie de *Leishmania* pode estar implicada em diferentes tipos de apresentações clínicas da LTA, e esta diversidade de manifestações da doença se sobrepõe a um perfil de resposta imunológica que contribui para a patogenia ou cura. A LC, considerada a forma mais comum, é caracterizada por lesões cutâneas, geralmente únicas ou em pequeno número, que tendem à cicatrização de maneira espontânea ou após o tratamento. No Brasil, a principal espécie relacionada a essa forma é a *L. braziliensis*, mas também pode ser causada por *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (Silveira et al. 2004). Esta manifestação está associada com uma produção moderada de anticorpos específicos que varia em função do tempo de infecção e da carga parasitária (Gutierrez et al. 1991).

Já foi documentada, em modelo experimental, uma associação entre o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1, com produção de citocinas inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF, e a resistência à infecção por *Leishmania* (Von Stebut et al. 2003). Por outro lado, a susceptibilidade à infecção já foi associada à indução de uma resposta do tipo Th2, com produção de citocinas como IL-4 e IL-5 (Scott et al. 1991, Kropf et al. 2005). Entretanto, paradoxalmente, a resposta Th1 sem uma modulação apropriada pode ser responsável pela patologia da doença (Bacellar et al. 2002, Martin & Lebovich, 2005, Bittar et al. 2007), enquanto a resposta Th2, em níveis moderados, pode contribuir para a cicatrização da lesão (Belkaid et al. 2001, Yoshimura et al. 2006, Pasparakis et al. 2014). Além disso, essa relação Th1 x Th2 não é observada em casos humanos e em alguns modelos de leishmaniose visceral (Melby et al. 2001). Contudo, Gomes-Silva e colaboradores (2007) demonstraram que a evolução para a cura não depende do domínio de apenas um dos perfis de resposta, mas sim de um balanço entre elas. A produção de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$ ) e regulatórias (IL-10) deve ocorrer em proporções balanceadas o suficiente para o controle da infecção. Este equilíbrio entre a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 é semelhante ao que ocorre em indivíduos que evoluem para cura espontânea e em indivíduos que não desenvolvem manifestações clínicas, onde o balanço entre a secreção de citocinas inflamatórias e regulatórias permite a morte do parasito sem gerar danos teciduais, demonstrando que este padrão pode estar relacionado à cura (Gomes-Silva et al. 2007).

Além das células Th1 e Th2, um perfil de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 (Th17) foi descrito como um forte candidato associado ao processo patogênico em doenças causadas por patógenos intracelulares (Bi et al. 2007). Esta interleucina é altamente inflamatória e induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF (Maspi et al. 2016). Células produtoras de IL-17 desempenham um importante papel no recrutamento de neutrófilos em estágios iniciais de infecção, além de estarem associadas a doenças autoimunes e inflamações crônicas (Soong et al. 2012). Em relação à LC, Gozales-Lombana e colaboradores (2013) observaram que o bloqueio de IL-10 em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* levou a uma imunopatologia grave caracterizada por níveis elevados de IL-17 e recrutamento de neutrófilos. De maneira semelhante, Lopez Kostka e colaboradores (2009) associaram a susceptibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major* à produção de IL-17 por neutrófilos, através da observação de que camundongos deficientes em IL-17 apresentaram menor número de neutrófilos



e desenvolveram lesões cutâneas menores e com carga parasitária mais baixa. Estudos demonstraram que a produção de IL-17 em indivíduos com LC e LM foi significativamente maior do que em indivíduos não infectados, demonstrando a relação desta citocina com a patogênese da doença (Bacellar et al. 2009). Entretanto, de maneira controversa, Novoa e colaboradores (2011) observaram que a produção de IL-17 foi mais elevada em indivíduos com infecção subclínica do que em indivíduos com LC. Também de maneira contrastante, alguns trabalhos associam elevados níveis de IL-17 e IL-22 à proteção na LC (Wu et al. 2010, Banerjee et al. 2016). Dessa forma, o verdadeiro papel das células Th17 na imunopatogênese da LTA ainda não está claro.

Outra subpopulação de linfócitos T que participa da resposta imunológica na LTA compreende as células T regulatórias (Treg). Os mecanismos pelos quais as células Treg regulam a resposta imunológica incluem a supressão por contato célula a célula mediado pelo receptor inibitório CTLA-4, o consumo excessivo de IL-2 pela própria célula Treg e a secreção de citocinas regulatórias (TGF- $\beta$  e IL-10), entretanto, sua atividade *in vivo* parece estar mais relacionada com a presença de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  (Read et al. 2000, O'Garra et al. 2004). O principal marcador específico desta linhagem é o fator transcricional *foxp3* (Beissert et al. 2006). Estudos com pacientes de LTA descreveram a presença de células Treg tanto na lesão quanto em sangue periférico. Campanelli e colaboradores (2006) descreveram a presença de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> produtoras de IL-10 com função reguladora em lesões cutâneas de pacientes infectados por *L. braziliensis*. Da mesma forma, em lesões recentes ou crônicas de LC causadas por *L. guyanensis* também foram localizadas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, e a presença de um maior percentual de células Treg sugere que o excessivo efeito inibidor destas células pode ser a causa das lesões crônicas (Bourreau et al. 2009). Também foi demonstrado que células Treg induzidas por antígenos de *L. guyanensis* poderiam apresentar capacidade de migrar do sangue periférico para o sítio da lesão (Kariminia et al. 2005). Em relação ao sangue circulante, Salhi e colaboradores (2008) observaram um percentual similar de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> produtoras de IL-10 entre indivíduos curados, assintomáticos ou pacientes com lesão ativa. Por outro lado, pôde-se observar na lesão um aumento do percentual de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> em modelos de cura espontânea em primatas não humanos infectados por *L. braziliensis*, quando comparado com o sangue circulante ou o

linfonodo drenante, apontando para o papel regulador dessas células para o processo de resolução das lesões (de-Campos et al. 2010).

Ao contrário do que se sabe em relação aos linfócitos T CD4, a função dos linfócitos T CD8 na infecção por *Leishmania* ainda não é bem definida. Enquanto alguns autores argumentam que estas células participam do estabelecimento e progressão da doença, principalmente através de mecanismos citotóxicos que podem promover a injúria do tecido (Barral-Netto et al. 1995, Brodskyn et al. 1997, Santos et al. 2013), outros afirmam que estes linfócitos podem estar envolvidos no processo de cura da leishmaniose (Da-Cruz et al. 1994, Coutinho et al. 1996, Da-Cruz et al. 2002, Brelaz-de-Castro et al. 2012).

Outra forma clínica da LTA é a LM, que se caracteriza pela destruição de tecido mucoso, preferencialmente da boca e nariz, em decorrência de uma intensa resposta inflamatória aos antígenos de *Leishmania*. São comuns nesta forma clínica a evolução crônica de longa duração, baixa resposta ao tratamento e frequentes episódios de recidiva (Zajtchuk et al. 1989, Amato et al. 2003). Quanto à resposta de anticorpos, os indivíduos com LM apresentam elevados títulos de imunoglobulinas anti-*Leishmania*, (Junqueira Pedras et al. 2003) que não correlacionam com a escassez de formas amastigotas observada nos fragmentos de tecido da mucosa afetada. Além disso, também já foi observado que, quando comparados à forma cutânea, pacientes de LM demonstram maior resposta proliferativa de células T específicas, tanto *in vivo* (intradermorreação de Montenegro – IDRM) quanto *in vitro* (Castes et al. 1983), sugerindo que a exacerbação da imunidade específica pode levar à maior gravidade das manifestações clínicas da LTA.

A resposta inflamatória na LM é exacerbada, com níveis de produção de IFN- $\gamma$  e TNF bem maiores do que aqueles produzidos por indivíduos com LC (Castes et al. 1983, Carvalho et al. 1985, Da-Cruz et al. 1996, Ribeiro-de-Jesus et al. 1998, Oliveira et al. 2014). Foi observado que dentre os indivíduos com LM avaliados longo tempo após a cura, existe um grupo que mantém níveis bastante elevados de produção de IFN- $\gamma$  por PBMC, sendo este achado menos evidente nos pacientes de LC (Da-Cruz et al. 2002). Além disso, já foi observado nos indivíduos LM uma baixa produção de IL-10 por células do sangue circulante e baixa expressão de seu receptor em fragmento de tecido retirado da lesão, o que pode levar à manutenção de altos níveis de IFN- $\gamma$  e assim contribuir para a patogênese da doença (Bacellar et al. 2002, Da-Cruz et al. 2002, Faria et al. 2005). Além dos indivíduos com um bom prognóstico da doença (assintomáticos, cura espontânea e pacientes curados de

LC) apresentarem uma maior capacidade de produzir IL-10 do que os pacientes curados de LM (Gomes-Silva et al. 2007, Bittar et al. 2007), nota-se ainda nesses casos uma relação equilibrada entre IFN- $\gamma$  e IL-10, o que não é observado nos pacientes da forma mucosa (Gomes-Silva et al. 2007), provavelmente devido à sua dificuldade de modular a reação inflamatória exacerbada.

Foi demonstrado que indivíduos com LTA apresentaram maiores níveis séricos de IL-17 quando comparados aos indivíduos não infectados, sendo observada uma tendência a uma produção mais elevada em indivíduos com LM do que com LC. Esses níveis foram correlacionados positivamente com a presença de TNF e com a intensidade de células inflamatórias presentes nas lesões mucosas, sugerindo que a subpopulação de linfócitos Th17 pode contribuir para a intensificação do processo inflamatório (Bacellar et al. 2009). Boaventura e colaboradores (2010) observaram a presença de células Th17 em lesões mucosas, associada à presença de neutrófilos em regiões de injúria tecidual e à produção de citocinas como IL-1 e IL-6, sugerindo o envolvimento da IL-17 na patogênese da LM. Além disso, já foi observada uma maior atividade efetora de linfócitos T CD8<sup>+</sup> frente a macrófagos infectados com *Leishmania* nos pacientes com LM em comparação aos de LC (Brodskyn et al. 1997).

A LCD, uma manifestação rara e de difícil tratamento, caracteriza-se pela riqueza de parasito na lesão em decorrência de um déficit da resposta efetora específica ao antígeno de *Leishmania* (Bittencourt et al. 1992). A espécie relacionada a esta forma é a *L. (L.) amazonensis*. A ausência de resposta específica induzida por um padrão de resposta do tipo 2 está associada à desativação de macrófagos, responsáveis pela fagocitose e destruição de formas amastigotas. Quanto à resposta de anticorpos, esses indivíduos apresentam níveis bastante aumentados de imunoglobulinas específicas (Silveira et al. 2004). Carneiro e colaboradores (2009) observaram que a porcentagem de células Treg é mais elevada em pacientes de LCD do que nos casos de LC e LM, sugerindo que estas células poderiam estar modulando para baixo a resposta efetora nestes indivíduos.

#### **1.4 Resposta imune no processo de cura da leishmaniose tegumentar Americana**

O equilíbrio entre a resposta imunológica do hospedeiro e a capacidade de evasão do parasito pode determinar o tipo de evolução e a gravidade da LTA. Diante

disso, uma grande parte dos indivíduos se expõe ao parasito e adquire a infecção, mas sem desenvolver a doença (Souza et al. 1992). Este fenômeno pode ser, em parte, explicado pela manutenção de uma imunidade duradoura, indicando que o frequente estímulo parasitário pode conferir proteção contra reinfecções ou reativação da leishmaniose (Bittar et al. 2007).

Indivíduos infectados por *L. braziliensis* que não desenvolvem as manifestações clínicas da doença apresentam baixos níveis de produção de IFN- $\gamma$  e TNF e altos níveis de IL-5, quando comparados com pacientes com LC ativa (Follador et al. 2002, Maspi et al. 2016). Isso indica que indivíduos que não desenvolvem a doença após a infecção provavelmente são capazes de modular sua resposta imunológica, produzindo citocinas inflamatórias em níveis adequados para o controle do parasito (Follador et al. 2002). Bittar e colaboradores (2007) observaram que o estímulo de PBMC de indivíduos que vivem em áreas endêmicas de leishmaniose com antígenos de *Leishmania* provocou uma expansão maior de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> nos assintomáticos quando comparados aos indivíduos curados de LC, o que sugere uma manutenção de células T por longo tempo. Além disso, é discutida a possibilidade de os indivíduos assintomáticos serem capazes de resolver a infecção através de mecanismos inatos da resposta imune, o que pode explicar os baixos níveis de produção de citocinas inflamatórias (Novoa et al. 2011).

Outro modelo de desfecho da LTA são os indivíduos com LC que evoluem espontaneamente para a cura clínica. Estes apresentaram uma forte resposta de células T específica aos antígenos de *Leishmania* associada a uma alta capacidade de produção de IFN- $\gamma$  (Carvalho et al. 1995). Além disso, já foi observado que o percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em apoptose dos indivíduos que evoluíram com cura espontânea é mais baixo em relação aos tratados com antimonial, sugerindo uma maior longevidade e provável capacidade efetora dessas células (Bertho et al. 2000). Contudo, esses indivíduos apresentam mecanismos imunológicos de regulação, como elevados níveis de produção de IL-10, o que pode suprimir a ação exacerbada de células T efetoras e assim propiciar um equilíbrio da produção de mediadores inflamatórios, possibilitando o controle do parasito sem causar danos teciduais (Bittar et al. 2007, Gomes-Silva et al. 2007, de-Campos et al. 2010).

Linfócitos T efetores específicos aos antígenos de *Leishmania* são observados nos sítios inflamatórios, portanto é provável que participem dos mecanismos imunológicos necessários para conter a replicação do parasito (Conceição-Silva et al. 1990, Pirmez et al. 1990, Da-Cruz et al. 2010). Em lesões

cutâneas de leishmaniose, quando comparadas a lesões mais recentes, foi observado um aumento de cinco vezes no número de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de granzima, sugerindo a participação dessas células no controle da LC (Faria et al. 2009). De maneira semelhante, em relação ao sangue periférico, indivíduos em processo de cura clínica apresentaram um aumento no percentual de células TCD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  (Toledo et al. 2001). Estes linfócitos circulantes podem expressar moléculas de migração que os direcionam para o tecido alvo (Picker 1994, Mendes-Aguiar et al. 2009). Após a cura clínica, ocorre uma redução da capacidade de migração dessas células para o sítio inflamatório, representada pela diminuição do percentual de linfócitos CLA<sup>+</sup> no sangue, iniciando então a redução do sítio inflamatório e o início do remodelamento tecidual (Mendes-Aguiar et al. 2009, Morgado et al. 2010). Provavelmente a permanência dessas células na ausência de mecanismos modulatórios pode contribuir para uma ação citotóxica continuada com possível efeito indesejado. Entretanto, a diminuição numérica de células inflamatórias, incluindo T CD8<sup>+</sup>, no local da cicatriz, com concomitante redução do percentual de células ativadas, ocorre somente anos após o estabelecimento da cicatrização (Morgado et al. 2010).

Tanto indivíduos curados de LC quanto os assintomáticos apresentam um perfil de indução preferencial de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em relação aos T CD8<sup>+</sup>, com produção de IFN- $\gamma$  e IL-10, baixos níveis de IL-5, mas não ausência de IL-4 (Da-Cruz et al. 2002, Bittar et al. 2007). Este achado é consistente com a observação de um perfil de resposta Th1 em indivíduos curados (Coutinho et al. 1996). Além disso, a influência de citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , tem sido descrita nos processos de cicatrização das lesões (Belkaid et al. 2002, Mendez et al. 2004).

Gomes-Silva e colaboradores (2009) demonstraram que o percentual de células T recém-ativadas frente aos antígenos de *Leishmania*, tanto T CD4<sup>+</sup> quanto T CD8<sup>+</sup>, se correlacionou negativamente com o tempo de cura. Também já foi observado que, um ano após o término do tratamento, ocorre uma diminuição no percentual das subpopulações de linfócitos T reativos aos antígenos de *Leishmania* (Da-Cruz et al. 2002). Além disso, o percentual de linfócitos T expressando o CLA na membrana reduz após a cura clínica, sugerindo que a diminuição da capacidade de migração para a pele deve favorecer a resolução da lesão (Mendes-Aguiar et al. 2009). Outra observação importante é a de que o tratamento precoce, ou seja, com menos de cinco semanas de evolução da lesão, leva a um aumento da incidência de

falha terapêutica (Machado et al. 2002), sugerindo que o tratamento possa interferir nos processos de geração da resposta imune protetora.

A definição da resposta imune celular associada à cura estável em indivíduos capazes de controlar a infecção por *Leishmania* pode auxiliar na identificação de parâmetros de resposta imune protetora. O entendimento de como essa resposta é iniciada e mantida após cessar o estímulo antigênico pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da doença.

### **1.5 O papel dos linfócitos B na infecção por *Leishmania***

A presença de linfócitos B em lesões de LTA já foi descrita há bastante tempo (Pessoa & Barreto, 1944), entretanto, a influência destas células na imunoproteção e na imunopatogênese da doença ainda não está elucidada. Estudos a respeito de plasmócitos intralesionais demonstraram uma variação tanto no número de plasmócitos presentes nas lesões, entre menos de 10% e mais de 50%, quanto nas prováveis funções dessas células e eficiência de ação de anticorpos secretados (IgG, IgA ou IgM) (Moriearty et al. 1982). Moriearty e colaboradores (1982) observaram uma correlação positiva entre o número de plasmócitos intralesionais e o tempo de evolução da lesão, porém nenhuma correlação entre níveis de anticorpos IgM, IgG e IgA totais e anti-*Leishmania* presentes no soro, e o número de plasmócitos intralesionais produtores dessas classes foi observada. Apesar de outros autores também terem descrito a presença de linfócitos B em lesões cutâneas localizadas, nenhuma evidência do papel funcional dessas células na LTA foi apresentada (Da-Cruz et al. 2005). Entretanto, surgiram especulações sobre a possibilidade dessas células B possuírem alguma importância na indução de uma resposta celular capaz de influenciar o desfecho da doença (Vieira et al. 2002). Através da avaliação de aspirados de linfonodos que drenam a lesão, foi observada maior proporção de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T CD8<sup>+</sup> na fase inicial da formação das lesões, enquanto na fase tardia, linfócitos B CD19<sup>+</sup> e células plasmáticas foram mais frequentes, associado a uma maior transcrição do gene de IL-10 (Bomfim et al. 2007).

Além da produção de anticorpos específicos com variadas funções e eficiência de ação, já foram descritas na literatura diversas outras funções associadas aos linfócitos B, tais como a eficiente função de célula apresentadora de antígenos (Pape et al. 2007), supressão de células Th1, Th2 e Th17 (células B

regulatórias) (Mauri & Bosma, 2012), auxílio na ativação de células Th foliculares (Malissen et al. 2009), indução e manutenção de células T reguladoras (Mann et al 2007, Amu et al. 2010), função efetora com produção de citocinas do tipo 1 (Be1) e do tipo 2 (Be2) e capacidade de ativação de células T CD4<sup>+</sup> em efectoras do tipo 1 e tipo 2 (Harris et al. 2000) .

Estudos em modelos experimentais a respeito da influência das células B na suscetibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania* apresentaram resultados controversos. A partir dos resultados de experimentos utilizando o modelo camundongo C3H/HeN infectado com *L. major*, Scott e colaboradores (1986) atribuíram aos linfócitos B um importante papel na geração de subpopulações de células T efectoras capazes de controlar a infecção. Esta afirmação foi devido à observação de que camundongos que sofreram depleção de linfócitos B através do tratamento com soro anti-IgM desenvolveram lesões maiores do que as desenvolvidas nos animais controles, e estas não cicatrizaram (Scott et al. 1986). Por outro lado, em modelo BALB/c infectado com *L. major* foi possível observar que a depleção de linfócitos B resultou em um efeito protetor observado pelo retardo no desenvolvimento da lesão, efeito este que foi revertido após a transferência adotiva de células T obtidas de animais portadores de linfócitos B, sugerindo uma provável participação de linfócitos B na geração de células T com função supressora da resposta celular (Sacks et al. 1984). Ronet e colaboradores (2010) demonstraram, através de experimentos com camundongos BALB/c, que linfócitos B produtores de IL-10 e com fenótipo de célula B regulatória (CD1d<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>) desempenham um papel na polarização da resposta Th2 e susceptibilidade à infecção por *L. major*. O mesmo grupo já havia associado a apresentação de antígenos por células B específicas à susceptibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major* (Ronet et al. 2008), e, neste trabalho mais recente, os autores observaram que os linfócitos B estimulados *in vitro* ou *in vivo* por antígenos de *L. major* expressaram as moléculas CD1d e CD5, além de produzirem IL-10, citocina que apresentou um efeito inibitório na produção de IL-12 por células dendríticas estimuladas por *L. major* (Ronet et al. 2010).

Apesar da proteção contra patógenos intracelulares ser geralmente associada à resposta imune celular, evidências recentes sugerem que linfócitos B e a imunidade humoral podem modular a resposta imune contra diversos patógenos intracelulares, inclusive *Leishmania*, através da apresentação de antígenos e da produção de citocinas e anticorpos (Culkin et al. 1997, Langhorne et al. 1998, Yang,

1998, Mastroeni et al. 2000, Woelbin et al. 2006, Kozakiewicz et al. 2013, Chan et al. 2014). Um desses estudos levou à descoberta de uma fase extracelular do ciclo de vida de *Ehrlichia chaffeensis*, uma bactéria considerada um parasito intracelular obrigatório, e que a imunidade humoral contribuiu para a proteção contra este patógeno (Li & Winslow, 2003). Essa evidência sugere que organismos intracelulares obrigatórios podem estar sujeitos a mecanismos de defesa mediados por anticorpos ao permanecerem, mesmo que brevemente, no meio extracelular. De fato, já foi mencionado que é provável que patógenos intracelulares permaneçam no meio extracelular em alguma fase do seu ciclo de infecção, deixando-os vulneráveis à ação de anticorpos (Casadeval, 2003). Rodrigues-Pinto e colaboradores (2014) demonstraram recentemente que linfócitos B podem induzir a ativação de células TCD4<sup>+</sup> e a produção de citocinas através da apresentação de antígenos de *Leishmania*. Também foi demonstrado que uma subpopulação de linfócito B (CD19<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) de sangue periférico de pacientes infectados por *M. tuberculosis* pode suprimir a resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de perfil Th17 (Zhang et al. 2012).

Os linfócitos B como células apresentadoras de antígenos podem apresentar diferentes funções efetoras com perfis de produção de citocinas diferenciados. Dependendo do ambiente de citocinas, linfócitos B podem se diferenciar em dois grupos de células efectoras: B efetora 1 (Be1), caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF, IL-10 e IL-6; e B efetora 2 (Be2), que produz IL-1, IL-2, IL-4, IL-13, TNF, IL-10 e IL-6. Através desta produção diferenciada de citocinas, as células Be1 e Be2 podem influenciar a diferenciação de células TCD4<sup>+</sup> *naive* em Th1 e Th2, respectivamente (Harris et al. 2000, Mauri & Bosma, 2012, Kozakiewicz et al. 2013). Esta modulação da função de células T pode indiretamente influenciar a biologia de macrófagos. As células B também já foram descritas com função de induzir e manter células T reguladoras (Mann et al. 2007, Amu et al. 2010, Mauri & Bosna, 2012)

A descrição do perfil das subpopulações de linfócitos B ao longo da evolução clínica de pacientes portadores de doenças infecciosas ainda não é conhecida. É de fundamental importância que sejam realizadas investigações que objetivem caracterizar melhor essas células, uma vez que algumas dessas subpopulações podem possuir uma importante influência no desenvolvimento da doença. Uma importante classificação de células B maduras tem sido utilizada através de marcações de moléculas de superfície CD19, CD38 e IgD por meio de ensaios citofluorimétricos. A partir destes marcadores podemos distinguir cinco populações



de linfócitos B em diferentes estágios de diferenciação com início em Bm1 (*naive*) e término em Bm5 (memória). Estas subpopulações de linfócitos B em indivíduos saudáveis estão circulantes em sangue periférico, e em equivalência proporcional quando comparadas com compartimentos linfóides secundários, como a tonsila (Bohnhorst et al. 2001). Em sangue periférico de indivíduos saudáveis foi observada uma frequência aproximada de 40% de células B de memória e 60% de células B *naive*, definidas através da quantificação de mutações nas regiões hipervariáveis do BCR (Klein et al. 1997). Recentemente, a subpopulação de células B regulatórias (Breg) tem sido definida pela combinação dos marcadores CD19<sup>+</sup>, CD24<sup>hi</sup>, CD38<sup>hi</sup>, CD5<sup>+</sup> e CD1d<sup>hi</sup> (Menon et al. 2016). Este subtipo é caracterizado por uma alta capacidade de produzir IL-10 com ação de inibir a diferenciação de células Th e favorecer a diferenciação de células TCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Mauri & Bosma 2012). Estudos demonstraram que a infecção por helmintos, que induz um perfil de resposta Th2, levou a um aumento de células Breg e a uma consequente melhora clínica da esclerose múltipla (Correale et al. 2008). Também já foi demonstrado que em condições patológicas com intensa ativação de linfócitos T (aumento da expressão de CD40L), é possível que ocorra uma intensa estimulação de linfócitos Breg via CD40, seguida de exaustão/perda da função reguladora, e mudança para função efetora, caracterizada pela capacidade de secreção de TNF (Desai et al. 1996, Jury et al. 2007).

## 1.6 O papel dos anticorpos na infecção por *Leishmania*

O conhecimento a respeito do perfil de produção de imunoglobulinas anti-*Leishmania* ainda é escasso, uma vez que os ensaios voltados a este tema visam principalmente o diagnóstico sorológico. Entretanto, já foi demonstrado que os anticorpos podem fazer parte de mecanismos de evasão de *Leishmania* e que a opsonização pode favorecer a sobrevivência deste parasito (Pleass & Wolf, 2001, Miles et al. 2005, Buxbaun, 2008).

A correlação positiva entre a cura clínica da LTA e o declínio dos títulos de imunoglobulinas já foi mencionada por diversos autores, sugerindo que a manutenção de níveis elevados de anticorpos anti-*Leishmania* após a cura pode ser uma maneira de predizer recidivas ou a evolução para formas mais graves da doença (Delgado et al. 1996, Amato et al. 1998, Brito et al. 2001, Fagundes-Silva et al. 2012). Fatores como a carga parasitária, o tempo de exposição à doença, a

forma clínica e o perfil de resposta imune induzido pelo parasito podem influenciar nos níveis de anticorpos presentes no sangue circulante (Gutierrez, 1991).

Plasmócitos de vida longa permanecem viáveis na medula óssea mesmo na ausência de estímulo antigênico devido às condições especiais fornecidas no compartimento deste órgão linfóide primário, as quais suprem estas células de estímulos protetores de apoptose. Este tipo celular pode ser responsável pela produção de imunoglobulinas após a cura clínica (Kaminski et al. 2012). Plasmócitos recém-ativados presentes no sangue periférico e que tendem a migrar para o sítio inflamatório também podem produzir esses anticorpos. Um sistema de detecção de imunoglobulinas em sobrenadante de cultura de PBMC foi padronizado para avaliação de indivíduos com infecção por *M. tuberculosis* em atividade, porém sem apresentar manifestações clínicas. Esses anticorpos seriam produzidos por plasmócitos presentes no sangue periférico recém-ativados por antígenos fornecidos pelo processo infeccioso em atividade (Raqib et al. 2004).

Os títulos de IgG total tendem a permanecer por um maior período de tempo após a cura clínica quando comparados com os níveis das suas subclasses. A citocina reconhecida pelo linfócito B no momento da sua interação com a célula Th folicular é o que vai determinar a nova classe de imunoglobulina a ser secretada (Abbas 2012), o que demonstra que as subclasses parecem refletir com mais precisão o perfil de resposta imune nos diferentes momentos clínicos da LTA. Tem sido observado em pacientes de LC um aumento na produção de IgG1 e IgG3, subclasses que são induzidas por um ambiente misto de citocinas que é ativado na presença do parasito (De Souza et al. 2005, Ozbilge et al. 2006, Pissinate et al. 2008). Resultados do nosso grupo demonstraram que os títulos de IgG1 e IgG3 quantificados no soro de pacientes pós-tratamento da LC tendem a se tornar semelhantes aos de indivíduos sem nenhum histórico da doença com aproximadamente dois anos de cura clínica estável. Dessa forma, a detecção sérica de IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* surge como uma possível ferramenta imunológica para auxiliar na definição da cura clínica da LC. Assim, a manutenção de níveis elevados dessas subclasses pode ser uma maneira de prever a reativação ou a evolução da doença para a forma mais grave.

Diante disso, nossa hipótese é que o perfil de subpopulações de linfócitos B que permanece após cura clínica difere entre grupos com sorologia positiva e negativa, e que essas células podem secretar anticorpos e produzir citocinas que

modulam negativamente a resposta imune celular, podendo favorecer a persistência parasitária.

## 1.7 Justificativa

A LC é uma doença de grande importância epidemiológica no Brasil e ainda hoje considerada um desafio para a saúde pública, uma vez que não estão disponíveis medidas eficazes de controle da doença. O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde, além de oneroso, possui longa duração e pode ocasionar efeitos adversos devido à alta toxicidade do medicamento, fatores estes que dificultam a adesão dos pacientes à terapia, que além de tudo não garante a cura definitiva. É comum após a cicatrização das lesões cutâneas a ocorrência de recidivas destas ou até mesmo evolução para a forma mais grave da doença, com o desenvolvimento de lesões mucosas. Os diversos desfechos clínicos estão relacionados com o perfil de resposta imune desenvolvido pelos hospedeiros frente à infecção por *Leishmania*. No entanto, ainda não estão disponíveis marcadores capazes de prever o prognóstico, bem como uma vacina eficaz.

O conhecimento sobre a imunopatogênese e a imunoproteção da LTA está focado principalmente na resposta de linfócitos T, e apesar da grande quantidade de estudos sobre a resposta imune anti-*Leishmania* ainda existem questões que não foram esclarecidas, como o porquê de não ocorrer a cura parasitológica mesmo após o tratamento específico. Os estudos de resposta humoral envolvem, sobretudo, a busca de alvos para diagnóstico sorológico, uma vez que há o paradigma de que os anticorpos não desempenham um papel relevante na patogênese da LTA. No entanto, há uma associação entre a gravidade da LTA e altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, assim como a persistência de sorologia positiva está relacionada com a manutenção da doença. Tem sido demonstrado que linfócitos B e anticorpos secretados podem influenciar o desfecho clínico de doenças infecciosas causadas por patógenos intracelulares, como o *M. tuberculosis*, através da modulação da resposta imune celular. Isso demonstra a importância e a necessidade de investigar o papel destes componentes humorais da resposta imune adaptativa no controle do patógeno e na imunopatogênese da LTA.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar se linfócitos B e anticorpos secretados desempenham um papel modulador da resposta imune celular no controle da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em indivíduos considerados curados longo tempo após o tratamento.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1 - Avaliar, em indivíduos curados, longo tempo após o tratamento, se seus anticorpos circulantes são oriundos de plasmócitos recém-ativados presentes no sangue circulante.

2 - Caracterizar o perfil fenotípico de linfócitos B do sangue periférico de indivíduos curados de LC.

3 - Avaliar se anticorpos secretados desempenham algum papel na resposta efetora contra a infecção por *Leishmania*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística e aspectos éticos

Setenta indivíduos clinicamente curados de leishmaniose cutânea longo tempo após o tratamento foram previamente recrutados para um estudo de avaliação da eficácia do tratamento com baixa dose de antimonial. Dentre esses pacientes, 37 (52,8%) foram tratados com dose baixa de Sb<sup>+5</sup> e 33 (47,2%) com dose convencional (tabela 2). Tais pacientes foram acompanhados por um período de aproximadamente 26 anos após o tratamento e não houve nenhum episódio de reativação da lesão cutânea ou evolução para a forma mucosa durante esse período. Todos os participantes foram atendidos e acompanhados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI – FIOCRUZ – RJ). Esses voluntários curados de LC foram agrupados de acordo com a positividade plasmática de IgG, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* como positivos (Ig+, n=17) e negativos (Ig-, n=16) (tabela 2). Voluntários sem histórico de LC residentes do estado do Rio de Janeiro também foram adicionados ao estudo (controle, n=19) (tabela 1). A coleta de sangue periférico e a utilização deste material biológico foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa – IPEC/FIOCRUZ (protocolo 2010). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas.

#### 3.2 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico e plasma

Aproximadamente 40 mL de sangue total foram coletados de cada participante através de punção venosa em tubos contendo heparina ou EDTA. O tubo de sangue em EDTA foi submetido à centrifugação para obtenção das amostras de plasma, que foram aliquoteadas e armazenadas a -20°C.

A partir do sangue heparinizado, células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) foram obtidas através de gradiente de centrifugação em Histopaque - 1077 de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA). Posteriormente, as células foram coletadas e criopreservadas em meio de congelamento [90% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, EUA)] previamente refrigerado à 4°C, obedecendo uma concentração de

$1 \times 10^7$  células/mL. Em seguida os microtubos contendo a suspensão celular em meio de congelamento foram acondicionados em gelo seco por 2 horas para serem posteriormente armazenados em nitrogênio líquido. Após o descongelamento das células foram obtidas uma recuperação e uma viabilidade celular acima de 90%.

### 3.3 Cultivo de formas promastigotas e preparação de antígeno total de *Leishmania braziliensis*

Formas promastigotas de *L. braziliensis* foram multiplicadas em meio Schneider suplementado com 1% L-glutamina, 10.000 UI/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma, EUA) e 10% de SFB. Após a cultura atingir a fase estacionária, as formas promastigotas foram coletadas e lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por centrifugação a 3000 rpm, 15 minutos a 4°C (THERMO Centrifuge CL40R - Thermo® Scientific). Para preparação dos antígenos a destruição das células foi realizada por quinze ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento com o auxílio de um vórtex. O antígeno total foi aliquoteado e armazenado a -20° C até o momento de uso. A concentração de proteínas do antígeno total foi dosada pelo método de Lowry (1951).

**Tabela 1:** Voluntários do estudo sem histórico de leishmaniose cutânea: ensaios laboratoriais.

Voluntário	Imunofenotipagem de linfócitos B	Dosagem de IgG1 e IgG3	Interação entre macrófago e <i>Leishmania braziliensis</i>
N006/08			X
N001/09			X
N005/09		X	X
N006/09		X	X
N013/09		X	X
N014/09			X
N004/10		X	
N009/10		X	
N010/10		X	
N015/10		X	
N017/10		X	
N021/10		X	
N003/12	X		
N004/12	X		
N005/12	X		
N006/12	X		
N002/13	X		
N003/13	X		
N004/13	X		

**Tabela 2:** Perfil de voluntários curados de leishmaniose cutânea: clínica, terapêutica e ensaios laboratoriais.

Voluntário	Esquema terapêutico	Tempo de cura (anos)	Ig	Imunofenotipagem de linfócitos B	Dosagem de IgG1 e IgG3 em SN	Ensaio de Interação entre macrófago e <i>L. braziliensis</i>
005/12	DC	16	p		X	X
012/12	DC	19	p		X	X
015/12	DC	15	p		X	
016/12	DC	20	p		X	
017/12	DC	21	p		X	
020/12	DC	21	p	X		
003/13	DB	12	p	X	X	X
005/13	DC	26	p	X	X	X
008/13	DB	25	p	X	X	
009/13	DC	15	p		X	
011/13	DB	15	p		X	X
013/13	DB	25	p		X	X
014/13	DB	16	p	X	X	
016/13	DB	14	p		X	X
017/13	DB	13	p		X	
020/13	DB	27	p		X	X
024/13	DB	7	p		X	
004/12	DC	-	n		X	X
006/12	-	-	n	X		
013/12	DC	21	n		X	X
014/12	DC	18	n		X	X
018/12	DC	20	n	X	X	X
021/12	DC	9	n	X	X	
004/13	DB	7	n	X	X	X
007/13	DB	14	n	X	X	
010/13	DB	16	n		X	X
015/13	DB	12	n		X	
018/13	DB	25	n	X	X	
019/13	DB	24	n		X	
021/13	DB	25	n		X	X
022/13	DB	15	n		X	
025/13	DB	6	n		X	
026/13	DB	8	n		X	X
019/12	-	-	-		X	
022/12	DC	19	-	X	X	
023/12	DC	21	-	X	X	
002/13	-	-	-		X	
006/13	DB	26	-	X	X	X
009/13	-	-	-	X		
012/13	DB	25	-	X	X	X
027/13	DB	7	-		X	

DC: dose convencional; DB: dose baixa; Ig: classificação em sorologia positiva (p) e negativa (n); SN: sobrenadante de cultura.

### 3.4 Quantificação de IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico

O ensaio ELISA (do Inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) para detecção das subclasses IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* foi realizado de acordo com Fagundes-Silva e colaboradores (2012).

Inicialmente, uma placa de 96 poços com fundo chato (Nunc Apogent, USA) foi sensibilizada com antígeno total de *L. braziliensis* diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) numa concentração de 40 µg/mL. Após incubação *overnight* a 4°C em câmara úmida, a placa foi lavada três vezes com 400 µL de tampão de lavagem (PBS + 0,05% de Tween (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). O tampão de bloqueio contendo PBS + 10% de SFB foi adicionado num volume de 200µL por poço, seguido por uma incubação de duas horas em temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem, 50 µL de amostras de sobrenadante de cultura celular de 72 horas foram adicionados aos poços e a placa foi incubada a 4°C por aproximadamente 12 horas. Após a realização de seis lavagens, foram adicionados 50 µL de anticorpo anti-IgG1 ou anti-IgG3 humana marcados com biotina (Invitrogen, Camarillo, CA, USA), diluídos em tampão PBS + 1% de SFB a uma proporção de 1:500 e 1:1000, respectivamente. Uma nova etapa de incubação de uma hora e 30 minutos foi realizada em temperatura ambiente. Após novo ciclo de seis lavagens foram adicionados 50 µL por poço de solução contendo avidina peroxidase (Sigma, EUA) diluída em PBS + 1% de SFB na proporção de 1:6000. Após incubação de uma hora em temperatura ambiente, um novo ciclo de seis lavagens foi realizado. Em seguida, foram adicionados 50 µL por poço da solução de substrato da reação, que consistiu na solução cromógena contendo 0,5 mg de o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma, EUA) e peróxido de hidrogênio a 30% diluídos em tampão fosfato-citrato (ph 5,5). A placa foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente em câmara escura e em seguida foram adicionados 50 µL por poço de ácido clorídrico (HCl) 2N como solução de parada da reação. A absorbância foi mensurada em leitor de ELISA (Biorad Benchmark, California, EUA) com filtro de comprimento de onda 490 nm. Os resultados foram expressos em densidade optica.



### 3.5 Cultivo de células mononucleares de sangue periférico e imunofenotipagem de linfócitos B por citometria de fluxo

Após o descongelamento, as PBMC previamente criopreservadas, provenientes de indivíduos curados de LC com sorologia positiva para antígenos de *L. braziliensis* (n=5), sorologia negativa (n=6), de indivíduos com dados sorológicos desconhecidos (n=4) e de indivíduos sem histórico de LC (n=6), foram contadas em câmara de Neubauer e cultivadas *in vitro* em placas de 96 poços, sendo adicionadas  $3 \times 10^5$  células por poço. As células foram mantidas em 200  $\mu$ L de meio RPMI + 10% de soro AB, com adição de 10  $\mu$ L de antígenos de *L. braziliensis* (estímulo específico) ou 10  $\mu$ L de *Toxoplasma gondii* (estímulo inespecífico) ou na ausência de estímulo antigênico, durante cinco dias em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (Panasonic COM-19AICUV-PA, Japão).

Para a marcação citofluorimétrica as PBMC foram coletadas dos poços e incubadas na presença de PBS Azida 0,1% + 10% de SFB durante 30 minutos a 4°C, consistindo na etapa de bloqueio. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos às moléculas de superfície (anti-CD20 PerCP, anti-CD19 APC-Cy7, anti-CD27 V500, anti-IgD PE e anti-CD38 PE-Cy7) para definir as diferentes subpopulações de linfócitos B (*naive*, memória inicial, memória e plasmócitos), através dos perfis fenotípicos demonstrados na tabela 3. Todos os anticorpos monoclonais utilizados neste estudo foram adquiridos da BD Biosciences®, Califórnia, EUA. Após a fixação com paraformaldeído 1% as células foram mantidas à 4°C até o momento da aquisição.

A aquisição das amostras foi realizada no equipamento FACS Aria II® (BD Biosciences), onde cerca de 100.000 eventos foram adquiridos a partir da região de linfócitos totais, definida através dos parâmetros de tamanho e granularidade celular. A análise dos resultados foi executada com o auxílio do *software* Kaluza®, versão 1.3 (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA).

**Tabela 3:** Fenótipo/função de linfócitos B e seus marcadores.

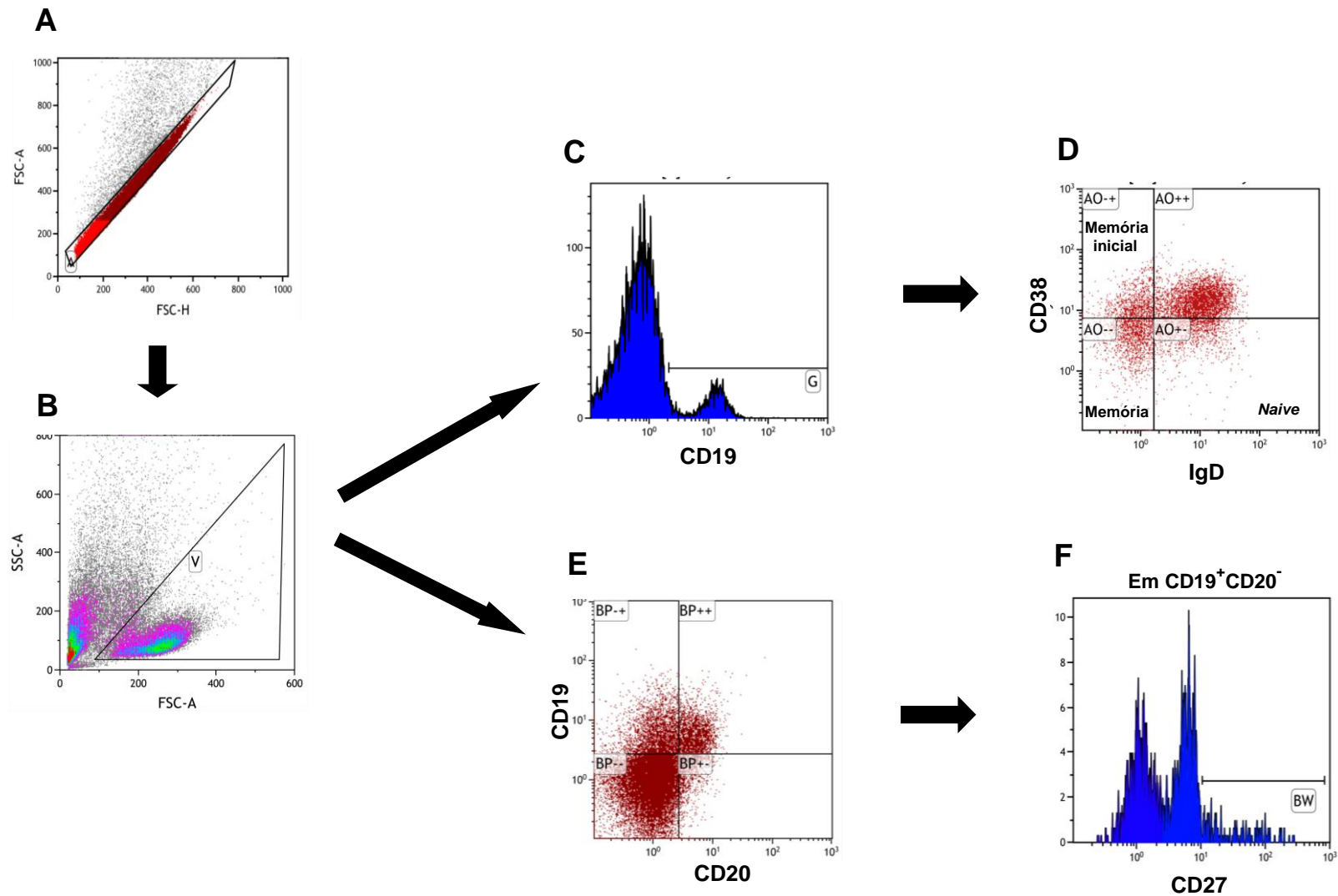
Fenótipo/função	Marcadores
Bm1 ( <i>naive</i> )	CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>
Bm5 inicial (memória inicial)	CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>
Bm5 (memória)	CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup>
Plasmócito	CD20 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>hi</sup>

### **3.5.1 Determinação da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada através do kit Live/Dead® (Invitrogen), segundo orientações do fabricante. Para esta análise, as células foram cultivadas e as amostras adquiridas e analisadas como citado anteriormente (item 3.5). A suspensão celular foi lavada com PBS e, após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de PBS. Posteriormente foi adicionado 1 µL do reagente marcador fluorescente e realizada uma incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após uma nova etapa de lavagem foram adicionados 100 µL de paraformaldeído 4%. Após uma incubação de 15 minutos a suspensão celular foi lavada com PBS + 1% de BSA (do Inglês, *bovine serum albumin*) e posteriormente mantida em 1 mL desta mesma solução até o momento da aquisição.

### **3.5.2 Estratégia de análise das subpopulações de linfócitos B**

Para definição dos percentuais das subpopulações, inicialmente foi criado um *dotplot* FSC-A x FSC-H (figura 3A), com o objetivo de excluir os aglomerados celulares (*doublets*). A partir desta região, um gráfico de tamanho *versus* granularidade foi criado para definir morfologicamente a região com maior concentração de linfócitos B viáveis (região V - figura 3B), a partir da qual foram definidas as subpopulações. Para determinar a porcentagem de linfócitos B *naive*, de memória inicial e de memória, a população CD19<sup>+</sup> foi definida através de um histograma (figura 3C) e a partir dela foi criado um *dotplot* CD38 x IgD, onde a população duplo negativa (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>) representa os linfócitos B de memória, a população CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> representa os de memória inicial e CD19<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup> as células B *naives* (figura 3D). A frequência de plasmócitos foi definida pela criação de um *dotplot* CD19 x CD20 (figura 3E) e a partir da população com fenótipo CD19<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup> foi criado um histograma de CD27 (figura 3F), onde a população *high* define os plasmócitos (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD27<sup>hi</sup>).



**Figura 3: Estratégia de análise das diferentes subpopulações de linfócitos B por citometria de fluxo multiparamétrica.** As células mononucleares de sangue periférico utilizadas nos ensaios citofluorimétricos foram cultivadas por cinco dias sem estímulo antigênico, ou estimuladas com antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ou de *Toxoplasma gondii*. Após a exclusão dos *doublets* (A) foi definida a região rica em linfócitos B (B). Estratégia de análise para definição das porcentagens de linfócitos B *naive*, de memória e memória inicial (C e D), e plasmócitos (E e F).

### **3.6 Ensaios de interação entre macrófagos e *Leishmania (Viannia) braziliensis* opsonizada com anticorpos**

#### **3.6.1 Cultivo de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Formas promastigotas de *L. braziliensis*, previamente armazenadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e colocadas em cultura em 10 mL de meio Schneider suplementado com 1% de L-glutamina, 10.000 UI/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 10% de SFB. Os parasitos foram incubados em estufa a 27°C (Labor, Presidente Prudente, SP, Brasil) e, após quatro dias, 1 mL da suspensão de *Leishmania* foi transferido para 10 mL de meio Schneider suplementado com 1% de L-glutamina, penicilina/estreptomicina, 10% de SFB e 2% de urina. Dois dias após a troca do meio, foi realizada uma nova cultura contendo inóculo inicial de  $5 \times 10^5$  formas promastigotas por mililitro de meio e incubadas por 4 dias a 27°C. Após término do período de cultura, as formas promastigotas, com até cinco passagens em cultivo, foram utilizadas para a infecção dos macrófagos.

#### **3.6.2 Diferenciação de monócitos de linhagem THP-1 em macrófagos**

Monócitos de linhagem THP-1 foram mantidos em cultura em 20 mL de meio RPMI contendo 10% de SFB em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (Panasonic COM-19AICUV-PA, Japão), sendo a troca do meio realizada a cada três dias. A suspensão celular foi centrifugada a 460 xg por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* de células foram adicionados 5 mL de meio RPMI, para que fosse realizada a contagem das células em câmara de Neubauer utilizando azul de Trypan 0,1% (Sigma) numa diluição de 1:10. Após a contagem, o volume de células foi reajustado para que cada poço de uma placa de 24 poços contendo uma lamínula estéril tivesse 400 µL de meio com uma concentração de  $1 \times 10^5$  células e 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) (Sigma) a 30 nM (Daigneault et al. 2010). Em seguida, as células foram incubadas durante três dias em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao terceiro dia, foram adicionados 400 µL de meio novo aos poços e as células foram novamente incubadas durante três dias. Passado esse período, os macrófagos foram infectados com as formas promastigotas de *L. braziliensis*.

### **3.6.3 Interação entre macrófagos e *Leishmania (Viannia) braziliensis* opsonizada**

Amostras de soro de indivíduos curados de LC com sorologia positiva para antígenos de *L. braziliensis* (n=5) e com sorologia negativa (n=5) foram inativadas a 56°C por 30 minutos e posteriormente diluídas nas proporções de 1:5 e 1:100 em meio Schneider. Formas promastigotas de *L. braziliensis* foram adicionadas a 200 µL dos respectivos soros inativados e incubadas por uma hora a 37°C. Após lavagem com 15 mL de PBS, aos parasitos foi adicionado meio RPMI acrescido de 1% de SFB e, em seguida, esta solução foi transferida para a placa de 24 poços contendo os macrófagos de linhagem THP-1, cultivados conforme descrito no item 3.5.2. Desta forma, foram adicionados 400 µL do meio contendo  $5 \times 10^5$  promastigotas por poço, obedecendo a proporção de 5:1 (*Leishmania*: macrófago). A placa contendo os macrófagos e as promastigotas foi mantida em estufa a 37°C durante 48h.

### **3.6.4 Controle de opsonização por imunofluorescência**

As formas promastigotas de *L. braziliensis* foram incubadas com soros inativados de acordo com o protocolo de interação entre macrófagos e *Leishmania* opsonizada (item 3.5.3). Após lavagem com PBS as promastigotas foram fixadas com paraformaldeído 1% durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, o anticorpo conjugado anti-IgG (Sigma) foi adicionado em uma diluição de 1:32 às promastigotas diluídas em PBS. Após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi adicionado meio de montagem para avaliação através de microscopia de fluorescência.

### **3.6.5 Coloração das lamínulas e montagem das lâminas**

Após o período de incubação, o sobrenadante de cultura foi aliquoteado e armazenado a -80°C para dosagem de citocinas e nitrito, e as lamínulas foram fixadas com metanol (Sigma). A coloração foi realizada pelo método Panótico Rápido (Renylab, Barbacena, MG), segundo as instruções do fabricante. Cada lamínula foi submergida por 5 segundos na primeira solução mantendo-se um movimento contínuo para os lados. Após a retirada do excesso da primeira solução com auxílio de papel absorvente, as lamínulas foram submersas da mesma maneira na segunda solução e posteriormente lavadas em água. Depois de 48h em

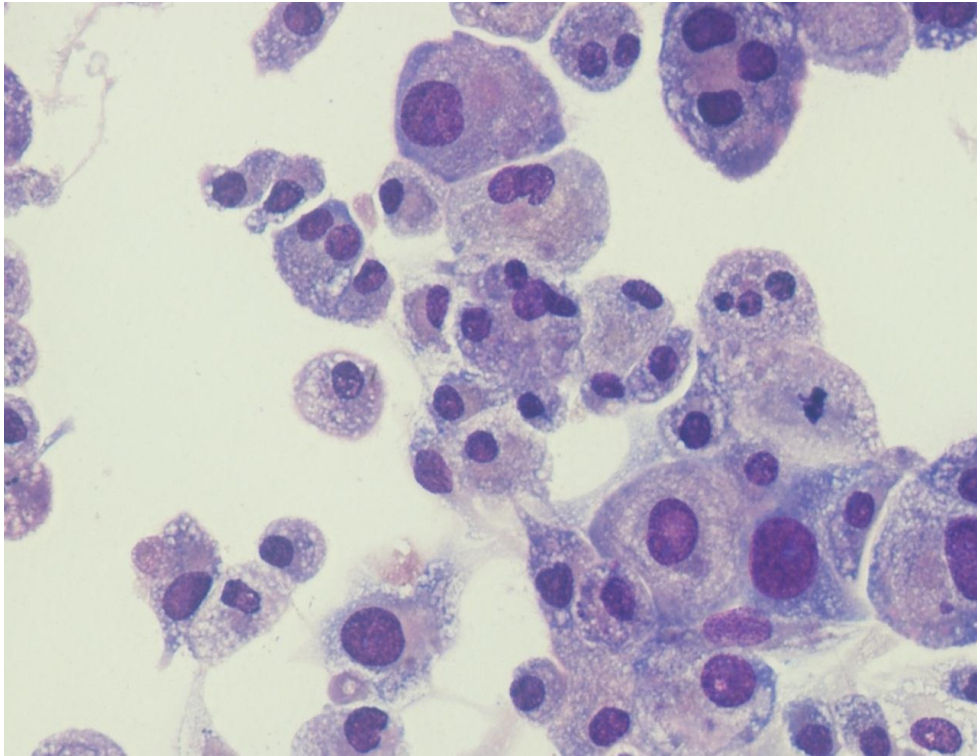
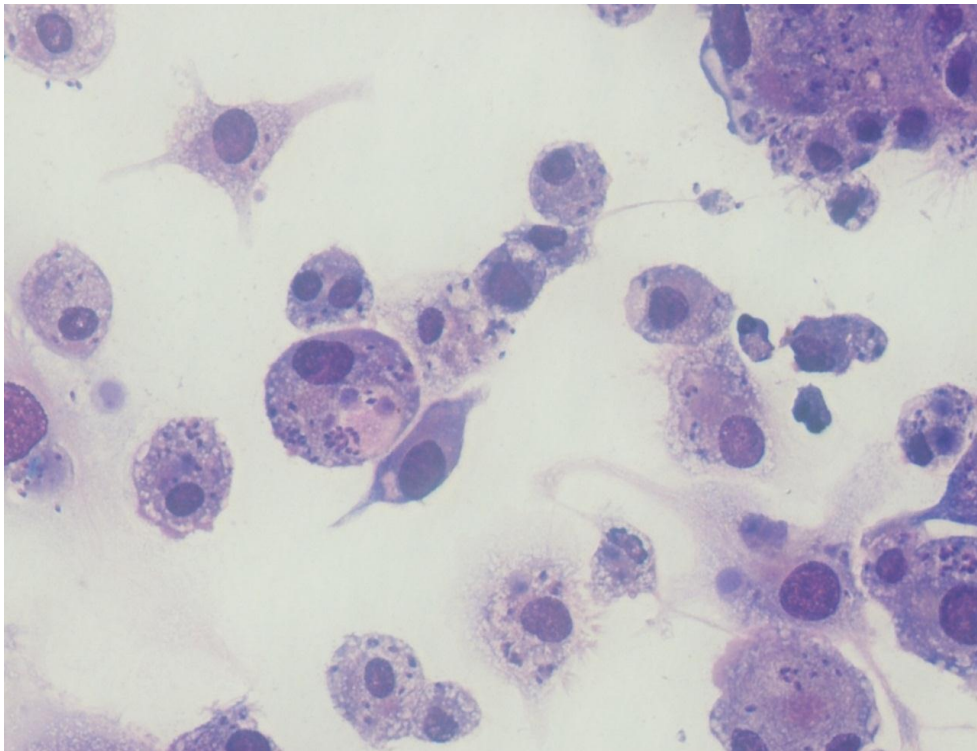
exposição à atmosfera para secagem, as lamínulas foram fixadas em lâminas com entelan (Sigma) e posteriormente utilizadas para a determinação da taxa e do índice de infecção.

### **3.6.6 Determinação da taxa e do índice de infecção dos macrófagos**

A contagem foi realizada através de microscopia de luz com objetiva de 40x, ocular de 16x e magnitude de 460x. Foram contados 100 macrófagos por lamínula e todas as amastigotas no interior destes macrófagos em campos com confluência em torno de 50%, uma vez que as células encontravam-se distribuídas de maneira heterogênea nas lamínulas (figura 4). A taxa de infecção foi determinada pela seguinte fórmula: (número de macrófagos infectados) / (número total de macrófagos). O índice de infecção foi definido como a quantidade média de amastigotas em cada macrófago, ou seja: (número total de amastigotas) / (número de macrófagos infectados).

### **3.6.7 Quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura dos macrófagos**

A quantificação das citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-1ra em sobrenadante de cultura foram realizadas através dos kits Quantikine<sup>®</sup> (R&D Systems, Mineapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada ensaio, foi realizada uma curva padrão para a comparação e obtenção dos resultados. Os sobrenadantes de cultura foram diluídos em reagente diluente de amostra (na proporção de 1:3) e um volume final de 200  $\mu$ L/poço foi adicionado à placa previamente adsorvida com anticorpos de captura, que foi incubada por duas horas em temperatura ambiente. Após a realização de quatro lavagens com 400  $\mu$ L de tampão de lavagem, foram adicionados 200  $\mu$ L do anticorpo conjugado por poço, sendo realizada uma nova etapa de incubação durante duas horas a temperatura ambiente. Depois de um novo ciclo de lavagens, foram adicionados 200  $\mu$ L da solução de substrato e, após 20 minutos de incubação ao abrigo da luz, foram adicionados 50  $\mu$ L de ácido clorídrico (HCl), utilizado como solução de parada da reação. As absorbâncias foram mensuradas com filtro 450 nm com correção com filtro 540nm. Os limites de detecção para IL-6 foi de 3,12 pg/mL até 300 pg/mL, para IL-1 $\beta$  foi de 3,9 pg/mL até 250 pg/mL e para IL-1ra foi de 15,62 pg/mL até 2000 pg/mL.

**A****B**

**Figura 4: Imagens de microscopia de luz de células THP-1 utilizadas para determinação da taxa e do índice de infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Imagens de microscopia de luz com objetiva de 40x de macrófagos não infectados (A) e macrófagos infectados por *L. braziliensis*.**

### **3.6.8 Quantificação de nitrito em sobrenadante de cultura dos macrófagos**

A concentração de óxido nítrico foi determinada através do método colorimétrico de Griess (Green et al. 1982). Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cultura, 25  $\mu\text{L}$  de N naftil 1% e 25  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida 0,1% em ácido fosfórico por poço. Após 10 minutos de incubação a absorbância foi lida em leitor de ELISA utilizando um comprimento de onda de 540 nm. As concentrações de óxido nítrico foram determinadas a partir de uma curva padrão realizada com uma solução de nitrito em meio RPMI, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78  $\mu\text{M}$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ .

### **3.7 Análise estatística**

Para as amostras que não assumiam uma distribuição Gaussiana, os testes não paramétricos Mann-Whitney, para comparação de dois grupos, e Kruskal-Wallis, para comparação de mais de dois grupos, foram escolhidos, e correlação de Spearman para análises de correlação. Para as amostras que assumiam uma distribuição Gaussiana foram utilizados o teste T, para comparação de dois grupos, e ANOVA, para comparação de mais de dois grupos, além do teste de Pearson para análises de correlação. O nível de significância dos testes teve erro alfa menor que 5%. Resultados foram considerados significantes estatisticamente quando  $p < 0,05$ . Todos os testes estatísticos foram realizados com auxílio do programa GraphPad Prism (versão 5.0, San Diego, California, USA).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Produção de IgG1 e IgG3 por plasmócitos de sangue circulante

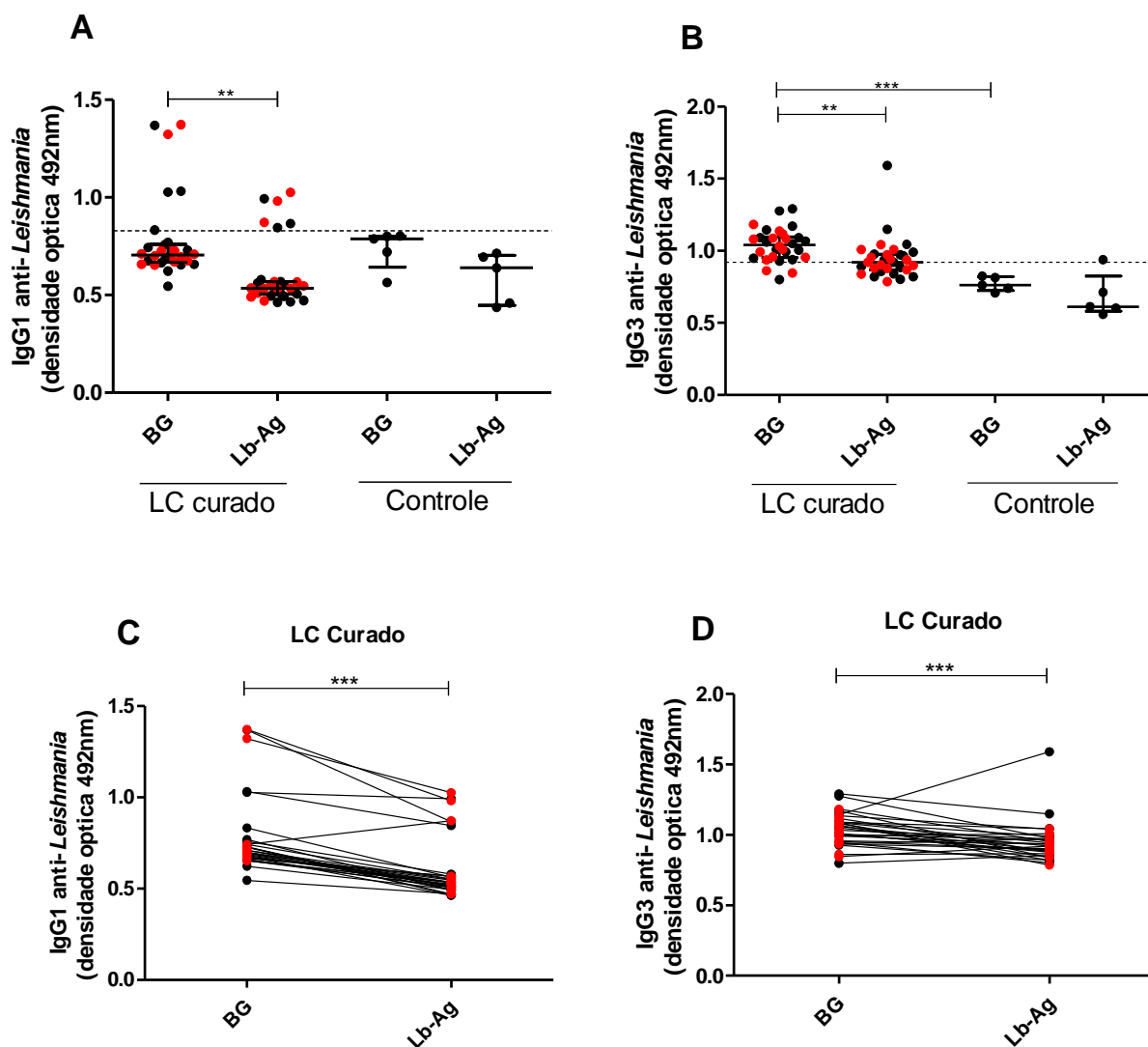
Com o objetivo de avaliar se os anticorpos presentes no soro de indivíduos clinicamente curados de LC longo tempo após o tratamento são provenientes de plasmócitos recém-ativados obtidos do sangue circulante, foi realizada a quantificação de IgG1 e IgG3 no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico mantidas *in vitro* por 72 horas, cultivadas na ausência de estímulo antigênico (BG) ou estimuladas com antígeno de *L. braziliensis* (Lb-Ag) (figura 5). Foram avaliados sobrenadantes de cultura de 15 pacientes com sorologia para *Leishmania* positiva para IgG total, IgG1 e/ou IgG3 e 13 com sorologia negativa. Além disso, também foram incluídos amostras de cinco indivíduos sem histórico de LC.

No entanto, independente do resultado sorológico, pode-se observar que 20% (6/30) indivíduos apresentaram produção de IgG1 em sobrenadante de cultura acima do valor de corte, tanto para as culturas estimuladas quanto não estimuladas com antígeno de *Leishmania*. O mesmo foi observado para IgG3, sendo 90% (27/30) dos indivíduos portadoras de células secretoras de IgG3 em sobrenadante de cultura quando não estimuladas com antígenos de *Leishmania* e 53% (16/30) dos indivíduos com células produtoras de IgG3 em sobrenadante de cultura na presença de antígenos de *Leishmania*.

Ao contrário do que se esperava, o estímulo das PBMC com antígenos de *Leishmania* não induziu aumento na produção de imunoglobulinas específicas, mas sim uma diminuição (figura 5C e 5D). Foi observada uma redução significativa ( $p < 0,01$  para o teste Kruskal-Wallis e  $p < 0,001$  para o teste Mann-Whitney) dos níveis médios de reatividade para IgG1 quando comparadas às culturas sem estímulo (BG;  $0,78 \pm 0,21$ ; mediana=0,70; IQR: 0,67-0,76) com as culturas estimuladas (Lb-Ag;  $0,60 \pm 0,17$ ; mediana=0,53; IQR: 0,50-0,57) (figura 5A). O mesmo foi observado para IgG3, tanto nas culturas sem estímulo antigênico (BG;  $1,04 \pm 0,11$ ; mediana=1,04; IQR: 0,95-1,09), quanto nas com estímulo antigênico (Lb-Ag;  $0,94 \pm 0,14$ ; mediana=0,87; IQR: 0,87-0,97) (figura 5B).

A concentração de IgG1 ou IgG3 no sobrenadante de cultura não apresentou correlação com os títulos observados nas amostras de soro dos mesmo indivíduos

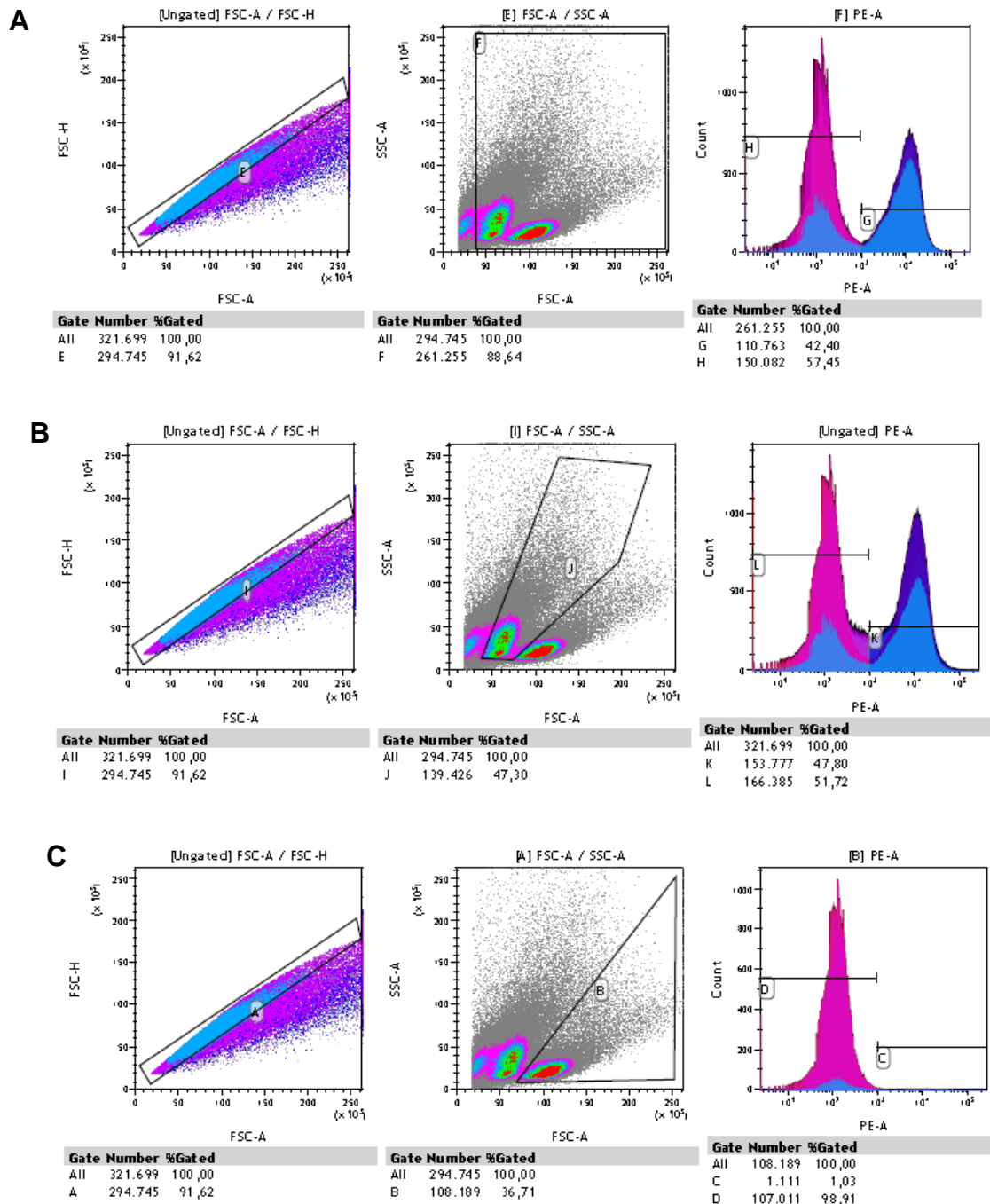
( $p > 0,05$ , dados não mostrados). Estes resultados sugerem que outras células, além dos plasmócitos circulantes, podem contribuir para a manutenção de anticorpos anti-*Leishmania* na circulação desses indivíduos.



**Figura 5: Quantificação de imunoglobulina(Ig)G1 e IgG3 secretadas por plasmócitos circulantes estimulados por antígenos de *Leishmania*.** Dosagem de IgG1 (A) e IgG3 (B) em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico provenientes de indivíduos curados de LC com sorologia positiva para IgG, IgG1 e/ou IgG3 específicas para *Leishmania* (n=15; ●) e sorologia negativa (n=15; ●), e de indivíduos sem histórico de LC (controle, n=5), cultivadas durante 72 horas sem estímulo antígeno (BG) ou estimuladas com antígenos de *Leishmania* (Lb-Ag). Comparação entre a secreção de IgG1 (C) e de IgG3 (D) antes e depois do estímulo antígeno. As Ig foram quantificadas por ELISA. As linhas contínuas horizontais em cada grupo representam o valor de mediana e os intervalos interquartis. Utilizados testes estatísticos Kruskal-Wallis (A e B) e Mann-Whitney (C e D). A linha pontilhada representa o valor de *cut off*, calculado pela fórmula: média dos controles + 2 vezes o desvio padrão. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 4.2 Perfil fenotípico de subpopulações de linfócitos B no sangue periférico de pacientes curados de leishmaniose cutânea.

Foram avaliadas as porcentagens das subpopulações de linfócitos B *naive*, de memória inicial, memória e plasmócitos em PBMC cultivadas por cinco dias sem estímulo antigênico ou estimuladas com antígenos de *L. braziliensis* ou *T. gondii*.

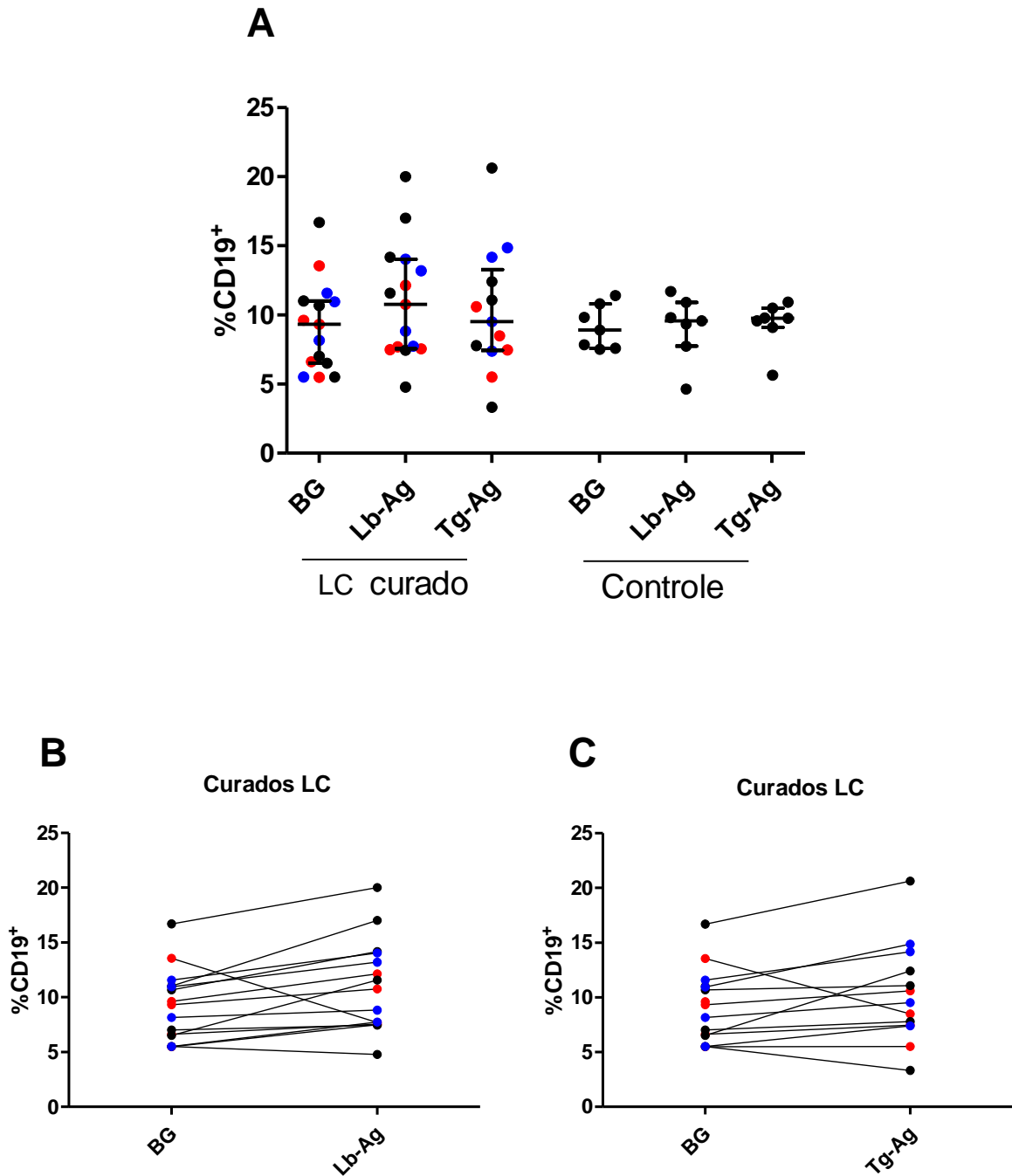


**Figura 6: Análise da viabilidade celular de células mononucleares de sangue periférico após o descongelamento.** Frequência de células viáveis em um *gate* que inclui as duas regiões com alta concentração celular (**A**), em um *gate* que inclui somente a região mais próxima do eixo y (**B**) e em um *gate* que inclui somente a região mais distante do eixo y (**C**). Análise de células de indivíduo curado de leishmaniose cutânea cultivadas na ausência de estímulo antigênico (BG).

A região a partir da qual foram determinadas as porcentagens das subpopulações de linfócitos B foi definida de acordo com a viabilidade celular. Após a exclusão dos *doublets* foram observadas duas regiões com alta concentração de células que expressam o marcador de linfócito B CD19. Ao traçar um *gate* que inclui estas duas populações celulares (figura 6A, região F), foi observado um percentual de células viáveis de 57,5% (figura 6A, região H) e 42,4% de células mortas (figura 6A, região G). A partir de um *gate* que inclui somente uma dessas populações, a que encontra-se mais próxima do eixo y (figura 6B, região J), foi observado 51,7% de células viáveis (figura 6B, região L) e 47,8% de células mortas (figura 6B, região K). Ao avaliar a viabilidade celular em um outro *gate* que inclui somente a população celular que se encontra mais afastada do eixo y (figura 6C, região B), foi observado um percentual de 98,91% de células viáveis e 1,03% de células mortas. Diante disto, a porcentagem das subpopulações de linfócitos B foi analisada a partir do *gate* B (figura 6C), região onde há uma concentração de células B e apresenta alta viabilidade celular.

A análise citofluorimétrica de PBMC de indivíduos curados de LC demonstrou que o percentual de células CD19<sup>+</sup> (BG: 9,2%±3,2%; mediana=9,3%; IQR: 6,5-11; n=15; Lb-Ag: 10,9%±4,1%; mediana=10,8%; IQR: 7,6-14; n=15; Tg-Ag: 10,2%±4,5%; mediana=9,5%; IQR: 7,4-13,3; n=13) foi similar ao observado nos indivíduos controle (BG: 9,1%±1,6%; mediana=8,9%; IQR: 7,6-10,8; n=7; Lb-Ag: 9,0%±2,3%; mediana=9,5%; IQR: 7,7-10,9; n=7; Tg-Ag: 9,6%±1,7%; mediana=9,7%; IQR: 9,1-10,5; n=7), independente do estímulo (figura 7A).

Nos indivíduos curados de LC, após o estímulo antigênico específico (Lb-Ag) não houve modificação no percentual de células CD19<sup>+</sup> (Lb-Ag: 10,9%±4,1%; mediana=10,8%; IQR: 7,6-14; n=15) quando comparado às células não estimuladas (BG: 9,2%±3,2%; mediana=9,3%; IQR: 6,5-11; n=15). Entretanto, em 8 dos 15 indivíduos curados de LC houve um aumento na porcentagem das células CD19<sup>+</sup> após o estímulo com antígeno de *L. braziliensis* em relação às células não estimuladas; em 6/15 dos voluntários os valores permaneceram inalterados após o estímulo com Lb-Ag e em 1 houve uma diminuição (figura 7B). O estímulo antigênico Tg-Ag também não alterou o percentual dessa subpopulação (Tg-Ag: 10,2%±4,5%; mediana=9,5%; IQR: 7,4-13,3; n=13) quando comparado com as células não estimuladas. Porém, em 5/13 dos indivíduos foi observado um aumento das células CD19<sup>+</sup> após o estímulo com Tg-Ag; em 6/13 os valores permaneceram inalterados e em 2/13 houve uma diminuição do percentual (figura 7C).



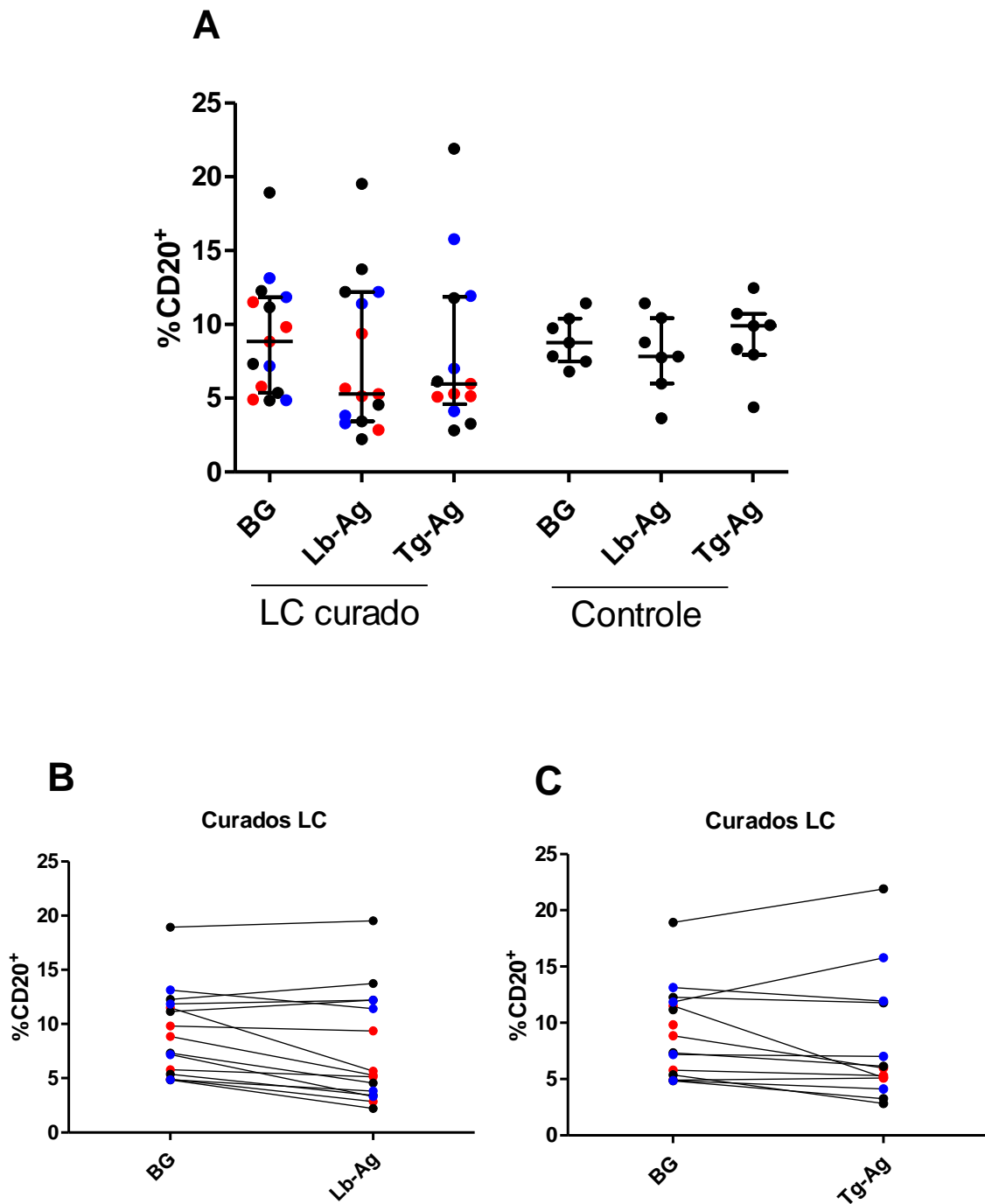
**Figura 7: Perfil de linfócitos B CD19<sup>+</sup> em pacientes curados de leishmaniose cutânea.** Frequência de linfócitos B CD19<sup>+</sup> (A) em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) provenientes de indivíduos curados de leishmaniose cutânea (LC) com sorologia anti-*Leishmania* positiva (n=5; ●), curados de LC com sorologia anti-*Leishmania* negativa (n=6; ●), curados de LC sem dados sorológicos (n=4; ●), e de indivíduos sem histórico de LC (Controle, n=7). Comparação do percentual de células CD19<sup>+</sup> entre as PBMC não estimuladas e as estimuladas com antígeno de *L. braziliensis* (Lb-Ag) (B), e entre as não estimuladas e as estimuladas com antígeno de *T. gondii* (Tg-Ag) (C). Para esta análise as PBMC foram cultivadas durante cinco dias sem estímulo antigênico (BG) ou na presença de Lb-Ag ou Tg-Ag. As linhas contínuas horizontais em cada grupo representam o valor da mediana e os intervalos interquartis. Utilizados testes estatísticos ANOVA (A) e Teste T (B e C). Cada ponto representa um indivíduo.

O mesmo foi observado para os indivíduos sem histórico de LC (grupo Controle), (BG: 9,1%±1,6%; mediana=8,9%; IQR: 7,6-10,8; n=7; Lb-Ag: 9,0%±2,3%; mediana=9,5%; IQR: 7,7-10,9; n=7; Tg-Ag: 9,6%±1,7%; mediana=9,7%; IQR: 9,1-10,5; n=7), sendo que em 1/7 dos indivíduos foi observado um aumento das células CD19<sup>+</sup> após o estímulo com Lb-Ag quando comparado às células não estimuladas, em 5/7 não houve alteração após o estímulo e em 1/7 houve uma redução no percentual. De maneira semelhante, o estímulo com Tg-Ag levou à alteração no percentual celular, sendo que em 2/7 dos indivíduos houve um aumento neste percentual, em 4/7 não houve alteração e em 1/7 houve uma queda na porcentagem de células CD19<sup>+</sup>.

Foram considerados como aumento nas porcentagens das subpopulações valores das células estimuladas 20% maiores do que os valores das células sem estímulo, e a redução nos percentuais foi considerada em valores 20% menores em relação às células não estimuladas, individualmente.

Em relação à frequência das células CD20<sup>+</sup>, também foram observados valores semelhantes das análises citofluorimétricas em PBMC de indivíduos curados de LC (BG: 9,2%±4,0%; mediana=8,8%; IQR: 5,4-11,8; n=15; Lb-Ag: 7,6%±5,1%; mediana=5,3%; IQR: 3,4-11,2; n=15; Tg-Ag: 8,2%±5,6%; mediana=6,0%; IQR: 4,6-11,9; n=13) em comparação às análises em PBMC de indivíduos sem histórico de LC (BG: 8,9%±1,7%; mediana=8,7%; IQR: 7,5-10,4; n=7; Lb-Ag: 8,0%±2,6%; mediana=7,8%; IQR: 5,9-10,4; n=7; Tg-Ag: 9,0%±2,6%; mediana=10,0%; IQR: 7,9-10,7; n=7), independente do estímulo (figura 8A).

O percentual de células CD20<sup>+</sup> em indivíduos curados de LC não aumentou após o estímulo antigênico específico (Lb-Ag: 7,6%±5,1%; mediana=5,3%; IQR: 3,4-11,2; n=15) em relação às células não estimuladas (BG: 9,2%±4,0%; mediana=8,8%; IQR: 5,4-11,8; n=15). Individualmente, a estimulação com Lb-Ag não promoveu um aumento na porcentagem de células CD20<sup>+</sup> em nenhum dos indivíduos curados de LC que foram analisados, porém em 8/15 os valores permaneceram inalterados e em 7/15 houve uma redução no percentual (figura 8B). De maneira semelhante, o estímulo com Tg-Ag não elevou os valores de células CD20<sup>+</sup> em relação às células não estimuladas (Tg-Ag: 8,2%±5,6%; mediana=6,0%; IQR: 4,6-11,9; n=13). Contudo, 1/13 dos indivíduos curados apresentou um aumento após o estímulo, em 8/13 não houve alteração no percentual e em 4/13 houve uma queda na frequência dessas células em relação às não estimuladas (figura 8C).



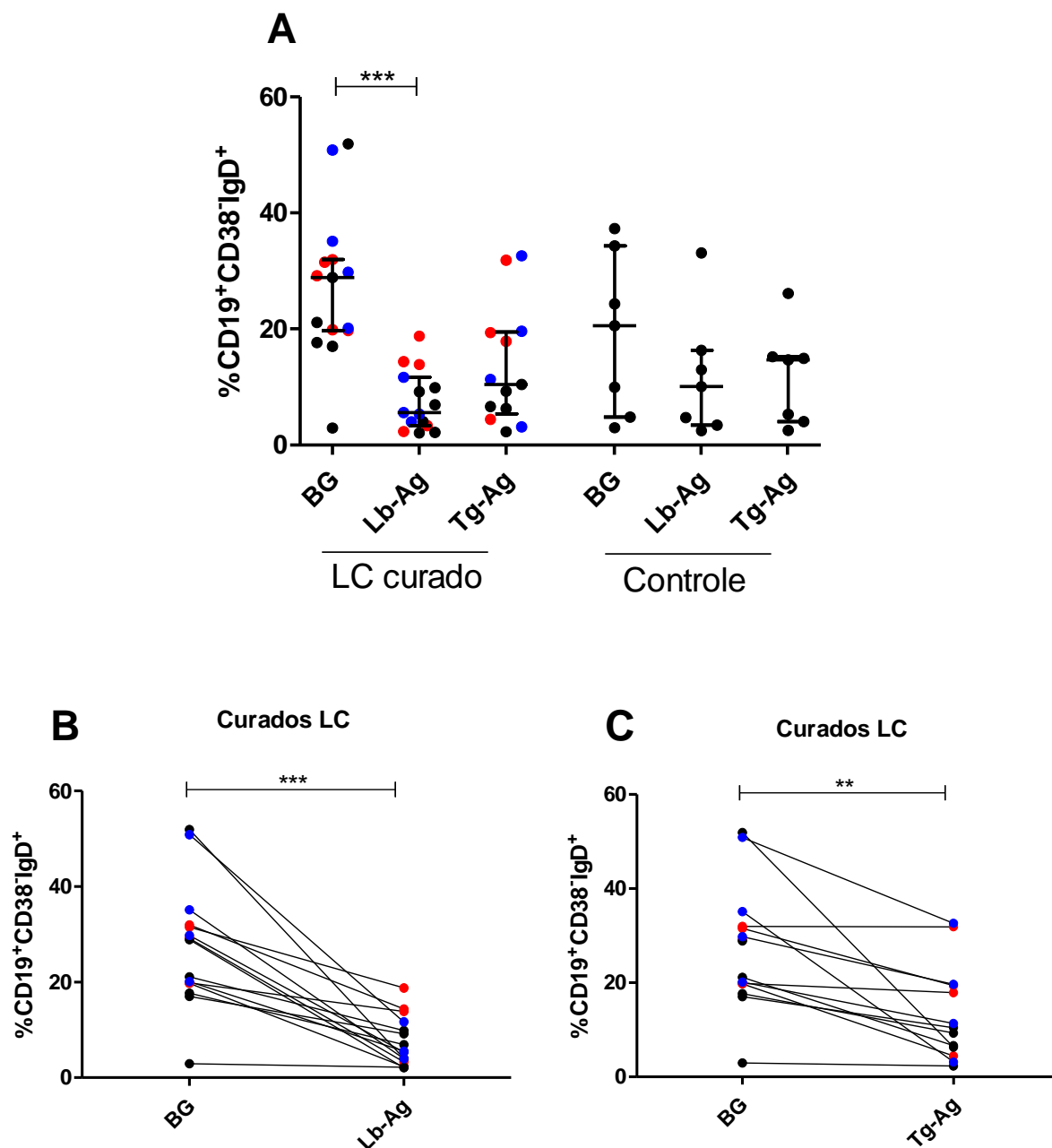
**Figura 8: Perfil de linfócitos B CD20<sup>+</sup> em pacientes curados de leishmaniose cutânea.** Frequência de linfócitos B CD20<sup>+</sup> (A) em PBMC proveniente de indivíduos curados de LC com sorologia anti-*Leishmania* positiva (n=5; ●), curados de LC com sorologia anti-*Leishmania* negativa (n=6; ●), curados de LC sem dados sorológicos (n=4; ●), e sem histórico de LTA (Controle, n=7). Comparação do percentual de células CD20<sup>+</sup> entre as PBMC não estimuladas e as estimuladas com antígeno de *L. braziliensis* (Lb-Ag) (B), e entre as não estimuladas e as estimuladas com antígeno de *T. gondii* (Tg-Ag) (C). Para esta análise as PBMC foram cultivadas durante cinco dias sem estímulo antigênico (BG), na presença de antígenos de *Leishmania* ou na presença de antígeno de *T. gondii*. As linhas contínuas horizontais em cada grupo representam o valor de mediana e os intervalos interquartis. Utilizados testes estatísticos ANOVA (A) e Teste T (B e C). Cada ponto representa um indivíduo.

Em relação ao grupo controle, foi observado o mesmo padrão (BG: 8,9%±1,7%; mediana=8,7%; IQR: 7,5-10,4; n=7; Lb-Ag: 8,0%±2,6%; mediana=7,8%; IQR: 5,9-10,4; n=7; Tg-Ag: 9,0%±2,6%; mediana=10,0%; IQR: 7,9-10,7; n=7), sendo que em 1/7 dos indivíduos foi observado uma elevação na porcentagem das células CD20<sup>+</sup> após o estímulo com Lb-Ag quando comparadas às células cultivadas na ausência de estímulo antigênico, em 5/7 não houve alteração nos valores e em 1/7 houve uma redução no percentual. Após o estímulo com Tg-Ag, o grupo controle também não apresentou diferença na frequência das células CD20<sup>+</sup> em relação às células não estimuladas, e a quantidade de indivíduos em que foi observado um aumento nesse percentual, uma diminuição ou nenhuma alteração foi a mesma observada para o estímulo com Lb-Ag.

A análise citofluorimétrica de PBMC demonstrou que o percentual de células *naive* (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>) não difere entre indivíduos curados de LC (BG: 27,2%±12,7%; mediana=28,9% ; IQR: 19,7-31,9; n=15; Lb-Ag: 7,5%±5,2%; mediana=5,6%; IQR: 3,3-11,7; n=15; Tg-Ag: 13,5%±10,2%; mediana=10,4%; IQR: 5,3-19,5; n=13) e indivíduos sem histórico de LC (BG: 19,2%±13,8%; mediana=20,6%; IQR: 4,8-34,3; n=7; Lb-Ag: 11,9%±10,7%; mediana=10,1%; IQR: 3,4-16,3; n=7; Tg-Ag: 11,8%±8,4%; mediana=14,7%; IQR: 4,0-14,2n=7), independente do estímulo (figura 9A). Entretanto, em relação aos indivíduos curados, ocorre uma redução significativa ( $p<0,001$ ) na porcentagem de células *naive* após o estímulo com Lb-Ag (Lb-Ag: 7,5%±5,2%; mediana=5,6%; IQR: 3,3-11,7; n=15) em comparação às células que foram cultivadas na ausência de estímulo antigênico (BG: 27,2%±12,7%; mediana=28,9% ; IQR: 19,7-31,9; n=15) (figura 9A e B). Em todos os voluntários curados de LC foi observada uma redução na porcentagem de células *naive* após o estímulo com Lb-Ag, e em nenhum deles houve um aumento ou a manutenção desses percentuais.

Foi observada uma redução significativa ( $p<0,01$ ) na frequência de células *naive* após o estímulo com Tg-Ag (figura 7C), sendo que em nenhum dos indivíduos (0/13) houve um aumento no percentual, em 2/13 os valores permaneceram inalterados e em 11/13 houve uma queda na porcentagem de células CD19<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup> após o estímulo (figura 9C).





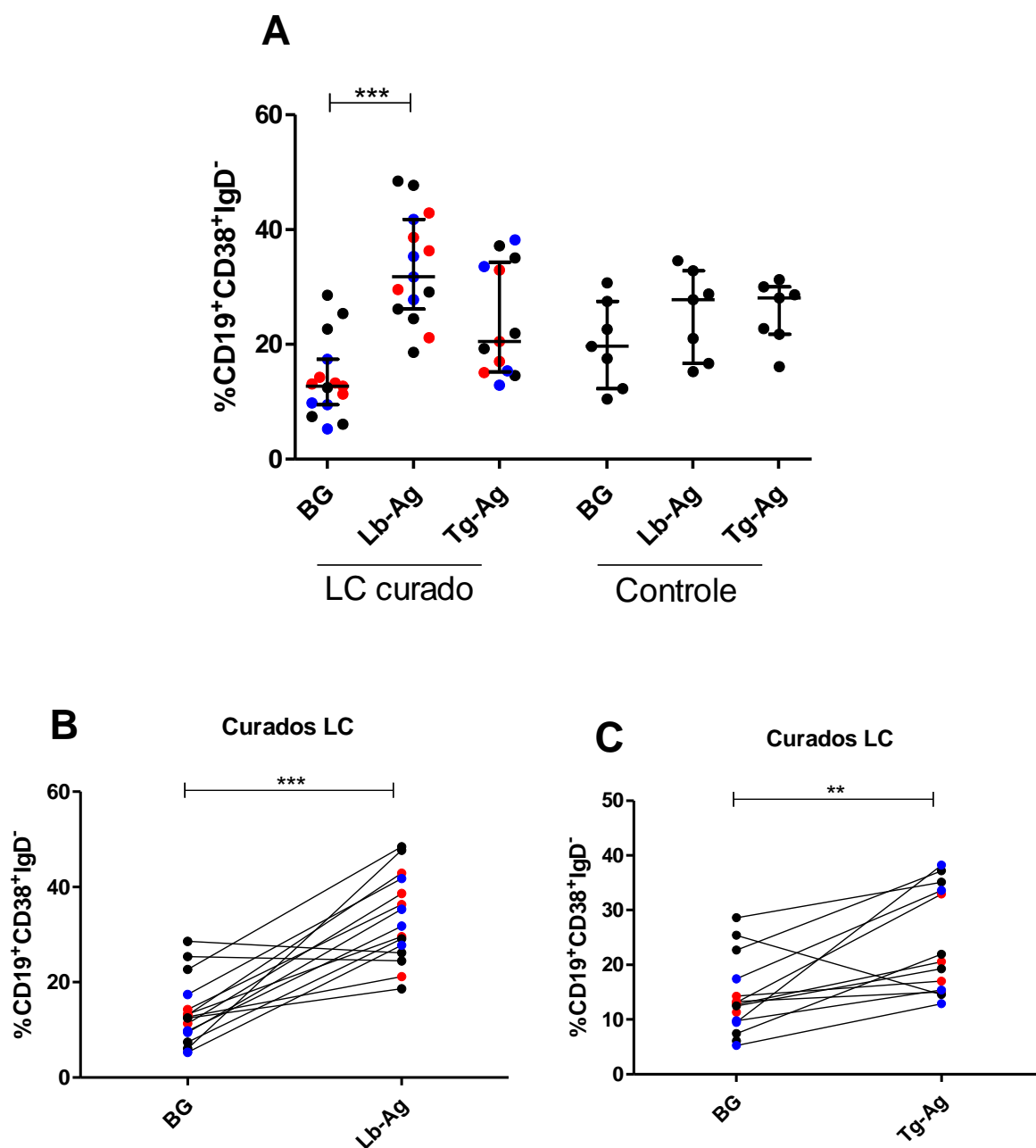
**Figura 9: Perfil de linfócitos B *naive* em pacientes curados de leishmaniose cutânea.** Frequência de linfócitos B *naive* (A) em PBMC proveniente de indivíduos curados de LC com sorologia anti-*Leishmania* positiva (n=5; ●), curados de LC com sorologia anti-*Leishmania* negativa (n=6; ●), curados de LC sem dados sorológicos (n=4; ●), e sem histórico de LC (Controle, n=7). Comparação do percentual de células *naive* entre as PBMC não estimuladas e as estimuladas com antígeno de *L. braziliensis* (Lb-Ag) (B), e entre as não estimuladas e as estimuladas com antígeno de *T. gondii* (Tg-Ag) (C). Para esta análise as PBMC foram cultivadas durante cinco dias sem estímulo antigênico (BG), na presença de Lb-Ag ou na presença Tg-Ag. As linhas contínuas horizontais em cada grupo representam o valor de mediana e os intervalos interquartis. Utilizados testes estatísticos ANOVA (A) e Teste T (B e C). \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001. Cada ponto representa um indivíduo.

Nos indivíduos do grupo controle, a presença de Lb-Ag ou de Tg-Ag nas culturas celulares não teve influência na frequência de células B *naive* (BG: 19,2%±13,8%; mediana=20,6%; IQR: 4,8-34,3; n=7; Lb-Ag: 11,9%±10,7%; mediana=10,1%; IQR: 3,4-16,3; n=7; Tg-Ag: 11,8%±8,4%; mediana=14,7%; IQR: 4,0-14,2n=7) (figura 9A). Em relação ao Lb-Ag, nenhum dos indivíduos (0/7) apresentou aumento nos percentuais após o estímulo, em 2/7 os valores permaneceram inalterados e em 5/7 houve uma redução. Após o estímulo com Tg-Ag, não foi observado um aumento nos percentuais em nenhum dos voluntários, em 2/7 a porcentagem permaneceu inalterada e em 5/7 ocorreu uma diminuição.

Quanto à frequência de linfócitos B de memória inicial (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) não houve diferença estatística entre os indivíduos curados de LC (BG: 13,9%±6,9%; mediana=12,7%; IQR: 9,4-17,4; n=15; Lb-Ag: 33,3%±9,2%; mediana=31,8%; IQR: 26,2-41,8; n=15; Tg-Ag: 24,1%±9,7%; mediana=20,5%; IQR: 15,2-34,3; n=13) e o grupo controle (BG: 20,1%±7,5%; mediana=19,7%; IQR: 12,3-27,5; n=7; Lb-Ag: 25,4%±7,7%; mediana=27,8%; IQR: 16,7-32,8; n=7; Tg-Ag: 25,5%±5,5%; mediana=28,0%; IQR: 21,7-30,0; n=7), independente do estímulo (figura 10A).

Nos indivíduos curados de LC, após a estimulação com Lb-Ag (Lb-Ag: 33,3%±9,2%; mediana=31,8%; IQR: 26,2-41,8; n=15), foi observado um aumento significativo ( $p<0,001$ ) na porcentagem de células B de memória inicial em relação às células não estimuladas (BG: 13,9%±6,9%; mediana=12,7%; IQR: 9,4-17,4; n=15) (figura 10A e B). Individualmente, 13/15 indivíduos apresentaram um aumento no percentual de células CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> após o estímulo com Lb-Ag, 2/15 mantiveram os valores inalterados e nenhum deles apresentou uma redução nos percentuais (figura 8B). Foi observado que o estímulo com Tg-Ag induziu um aumento significativo ( $p<0,01$ ) na frequência dessa subpopulação, sendo que em 10/13 houve um aumento, em 2/13 não houve alteração e em 1/13 houve uma redução no percentual após o estímulo (figura 10C).

As análises dos percentuais de linfócitos B de memória inicial em voluntários sem histórico de LC demonstrou que a estimulação com Lb-Ag ou com Tg-Ag não interferiu na porcentagem dessa subpopulação (BG: 20,1%±7,5%; mediana=19,7%; IQR: 12,3-27,5; n=7; Lb-Ag: 25,4%±7,7%; mediana=27,8%; IQR: 16,7-32,8; n=7; Tg-Ag: 25,5%±5,5%; mediana=28,0%; IQR: 21,7-30,0; n=7) (figura 10A), sendo que em 4/7 houve um aumento, em 3/7 não houve alteração e em nenhum deles houve uma redução, tanto após o estímulo com Lb-Ag, quanto após o estímulo com Tg-Ag.



**Figura 10: Perfil de linfócitos B de memória inicial em pacientes curados de leishmaniose cutânea.** Frequência de linfócitos B de memória inicial (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) (A) em PBMC proveniente de indivíduos curados de LC com sorologia anti-*Leishmania* positiva (n=5; ●), curados de LC com sorologia anti-*Leishmania* negativa (n=6; ●), curados de LC sem dados sorológicos (n=4; ●), e sem histórico de LC (Controle, n=7). Comparação do percentual de células B de memória inicial entre as PBMC não estimuladas (BG) e as estimuladas com antígeno de *L. braziliensis* (Lb-Ag) (B), e entre as não estimuladas e as estimuladas com antígeno de *T. gondii* (Tg-Ag) (C). Para esta análise as PBMC foram cultivadas durante cinco dias sem estímulo antigênico, na presença de Lb-Ag ou na presença Tg-Ag. As linhas contínuas horizontais em cada grupo representam o valor de mediana e os intervalos interquartis. Utilizados testes estatísticos ANOVA (A) e Teste T (B e C). \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001. Cada ponto representa um indivíduo.

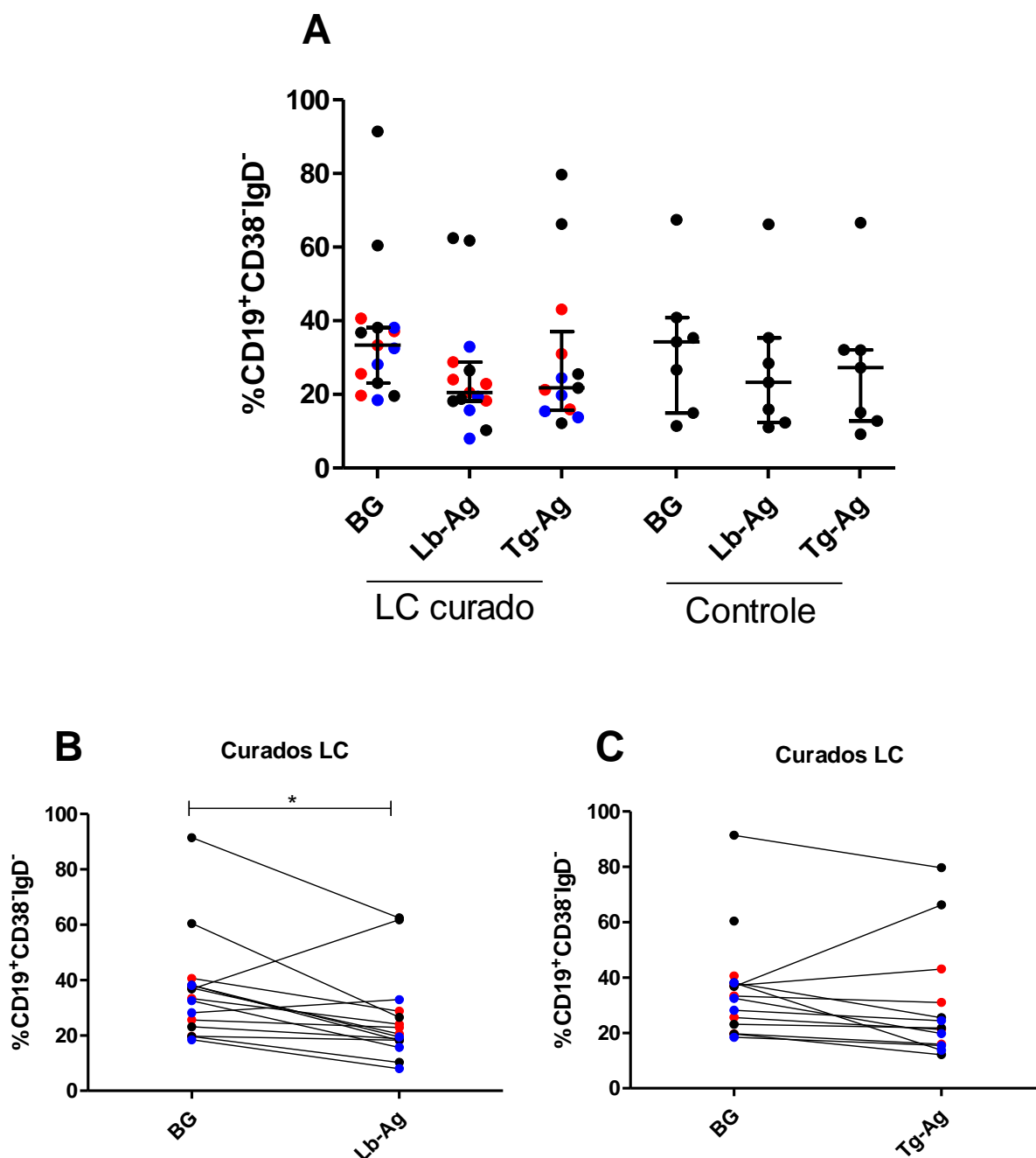
Quanto aos percentuais de linfócitos B de memória, os indivíduos curados de LC (BG: 36,2%±18,7%; mediana=33,4%; IQR: 23,2-38,1; n=15; Lb-Ag: 25,9%±16,0%; mediana=20,6%; IQR: 18,2-28,7; n=15; Tg-Ag: 30,0%±20,9%; mediana=21,8%; IQR: 15,7-37,1; n=13) apresentaram um perfil semelhante ao do grupo controle (BG: 33,0%±18,6%; mediana=34,3%; IQR: 14,9-40,8; n=7; Lb-Ag: 27,5%±19,2%; mediana=23,2%; IQR: 12,4-35,3; n=7; Tg-Ag: 27,9%±19,5%; mediana=27,2%; IQR: 12,8-32,1; n=7), independente do estímulo (figura 11A).

Nos indivíduos curados, após a estimulação com Lb-Ag foi observada uma redução estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) na porcentagem de linfócitos B de memória (figura 11B), sendo que em nenhum dos indivíduos foi observado um aumento deste percentual, em 5/15 não houve alteração e em 10/15 houve uma redução. Quanto ao estímulo com Tg-Ag, as análises demonstraram que a presença deste não alterou os percentuais desta subpopulação. Em 1/13 dos indivíduos curados houve um aumento, em 5/13 não alteração e em 4/13 houve uma redução do percentual de linfócitos B de memória após o estímulo com Tg-Ag. Quanto aos indivíduos do grupo controle foi observado que a estimulação antigênica não interferiu na frequência desta subpopulação. Em nenhum destes voluntários houve um aumento, em 5/7 os valores permaneceram inalterados e em 2/7 houve uma queda na porcentagem de células B de memória após o estímulo, tanto para Lb-Ag quanto para Tg-Ag.

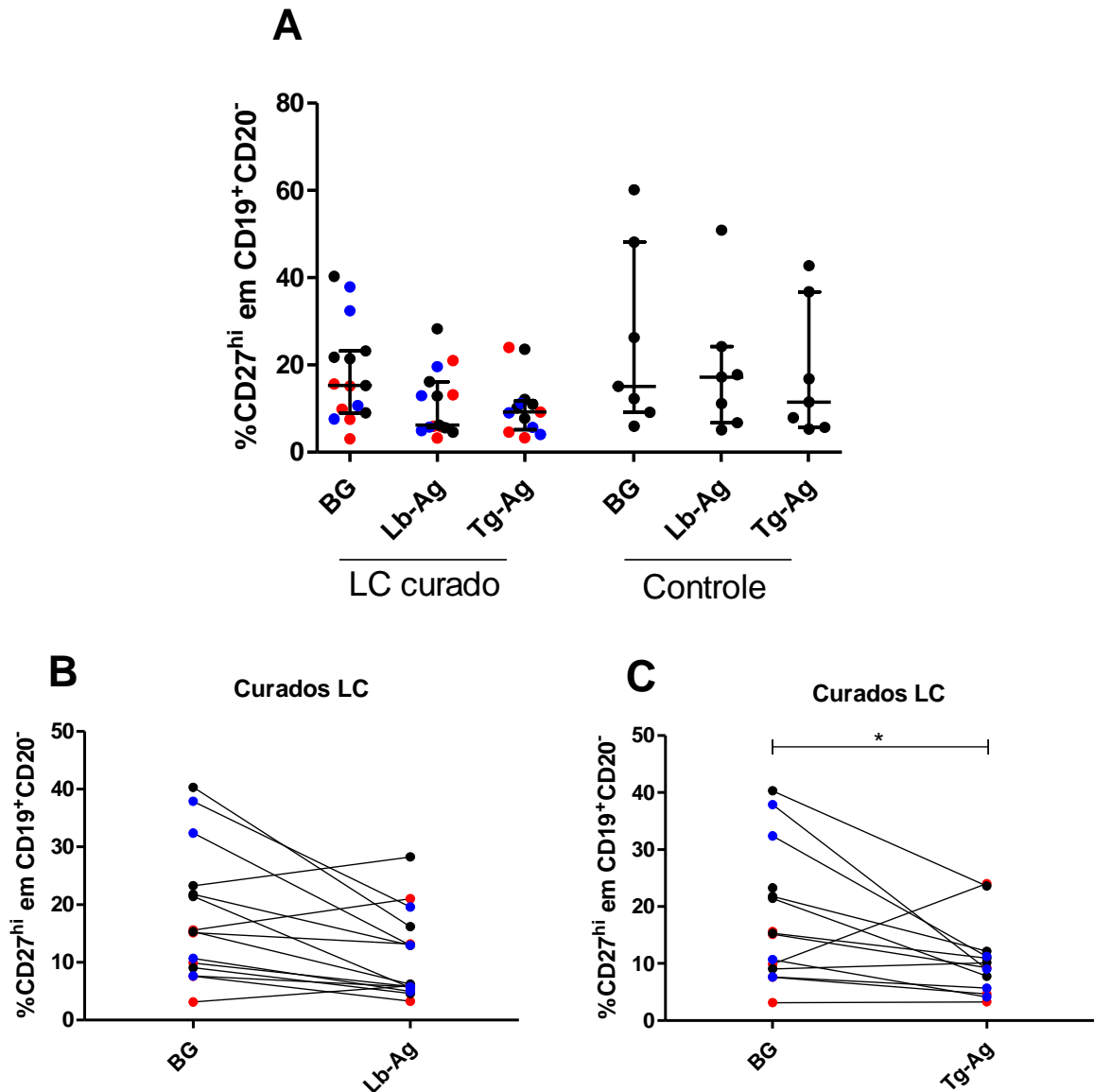
Quanto à frequência de plasmócitos ( $CD27^{hi}$  em  $CD19^+CD20^-$ ), não foi observada diferença significativa entre os indivíduos curados de LC (BG: 18,1%±11,4%; mediana=15,3%; IQR: 9,1-23,2; n=15; Lb-Ag: 11,1%±7,5%; mediana=6,2%; IQR: 5,6-16,2; n=15; Tg-Ag: 10,5%±6,6%; mediana=9,3%; IQR: 5,2-11,7; n=13) e os voluntários sem histórico de LC (BG: 25,3%±21,0%; mediana=15,1%; IQR: 9,2-48,2; n=7; Lb-Ag: 18,1%±15,4%; mediana=11,5%; IQR: 6,8-24,2; n=7; Tg-Ag: 3,6%±1,3%; mediana=3,5%; IQR: 5,7-36,7; n=7), independente do estímulo (figura 12A).

Após o estímulo com Lb-Ag não foi observada uma alteração estatisticamente significativa no percentual de plasmócitos nos indivíduos curados de LC (figura 14B). Entretanto, em 3/15 houve um aumento destes valores, em 1/15 não houve alteração e em 11/15 foi observada uma redução após o estímulo. Em relação ao estímulo com Tg-Ag, foi observada uma diminuição estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) em relação às PBMC não estimuladas (figura 14C). Em 1/13 indivíduos

aumentou a porcentagem desta subpopulação, em 2/13 não houve nenhuma modificação e em 10/13 houve uma queda nestes valores após o estímulo.



**Figura 11: Perfil de linfócitos B de memória em pacientes curados de leishmaniose cutânea.** Frequência de linfócitos B de memória (A) em PBMC proveniente de indivíduos curados de LTA com sorologia anti-*Leishmania* positiva (n=5; ●), curados de LC com sorologia anti-*Leishmania* negativa (n=6; ●), curados de LC sem dados sorológicos (n=4; ●), e sem histórico de LC (Controle, n=7). Comparação do percentual de células B de memória entre as PBMC não estimuladas (BG) e as estimuladas com antígeno de *L. braziliensis* (Lb-Ag) (B), e entre as não estimuladas e as estimuladas com antígeno de *T. gondii* (Tg-Ag) (C). Para esta análise as PBMC foram cultivadas durante cinco dias sem estímulo antigênico, na presença de Lb-Ag ou na presença Tg-Ag. As linhas contínuas horizontais em cada grupo representam o valor de mediana e os intervalos interquartis. Utilizados testes estatísticos ANOVA (A) e Teste T (B e C).\* p<0,05. Cada ponto representa um indivíduo.



**Figura 12: Perfil de plasmócitos em pacientes curados de leishmaniose cutânea.** Frequência de plasmócitos (A) em PBMC proveniente de indivíduos curados de LC com sorologia anti-*Leishmania* positiva (n=5; ●), curados de LC com sorologia anti-*Leishmania* negativa (n=6; ●), curados de LC sem dados sorológicos (n=4; ●), e sem histórico de LC (Controle, n=7). Comparação do percentual de plasmócitos entre as PBMC não estimuladas (BG) e as estimuladas com antígeno de *L. braziliensis* (Lb-Ag) (B), ou estimuladas com antígeno de *T. gondii* (Tg-Ag) (C). Para esta análise as PBMC foram cultivadas durante cinco dias sem estímulo antigênico, na presença de Lb-Ag ou na presença Tg-Ag. As linhas contínuas horizontais em cada grupo representam o valor de mediana e os intervalos interquartis. Utilizados testes estatísticos ANOVA (A) e Teste T (B e C). \* p<0,05. Cada ponto representa um indivíduo.

Quanto aos indivíduos sem histórico de LC não foi observado um aumento no percentual de plasmócitos em nenhum deles, em 4/7 os valores permaneceram inalterados e em 3/7 ocorreu uma redução após o estímulo com Lb-Ag. Nas PBMC cultivadas na presença de Tg-Ag, em comparação às células não estimuladas dos indivíduos do grupo controle, não ocorreu uma elevação na frequência de plasmócitos em nenhum deles, os valores permaneceram inalterados em 2/7 e em 5/7 houve uma redução.

Em todas as subpopulações analisadas as porcentagens foram semelhantes entre os indivíduos curados de LC com sorologia para *L. braziliensis* positiva e negativa.

**Tabela 4:** Porcentagem das subpopulações de linfócitos B em sangue periférico de indivíduos curados de leishmaniose cutânea.

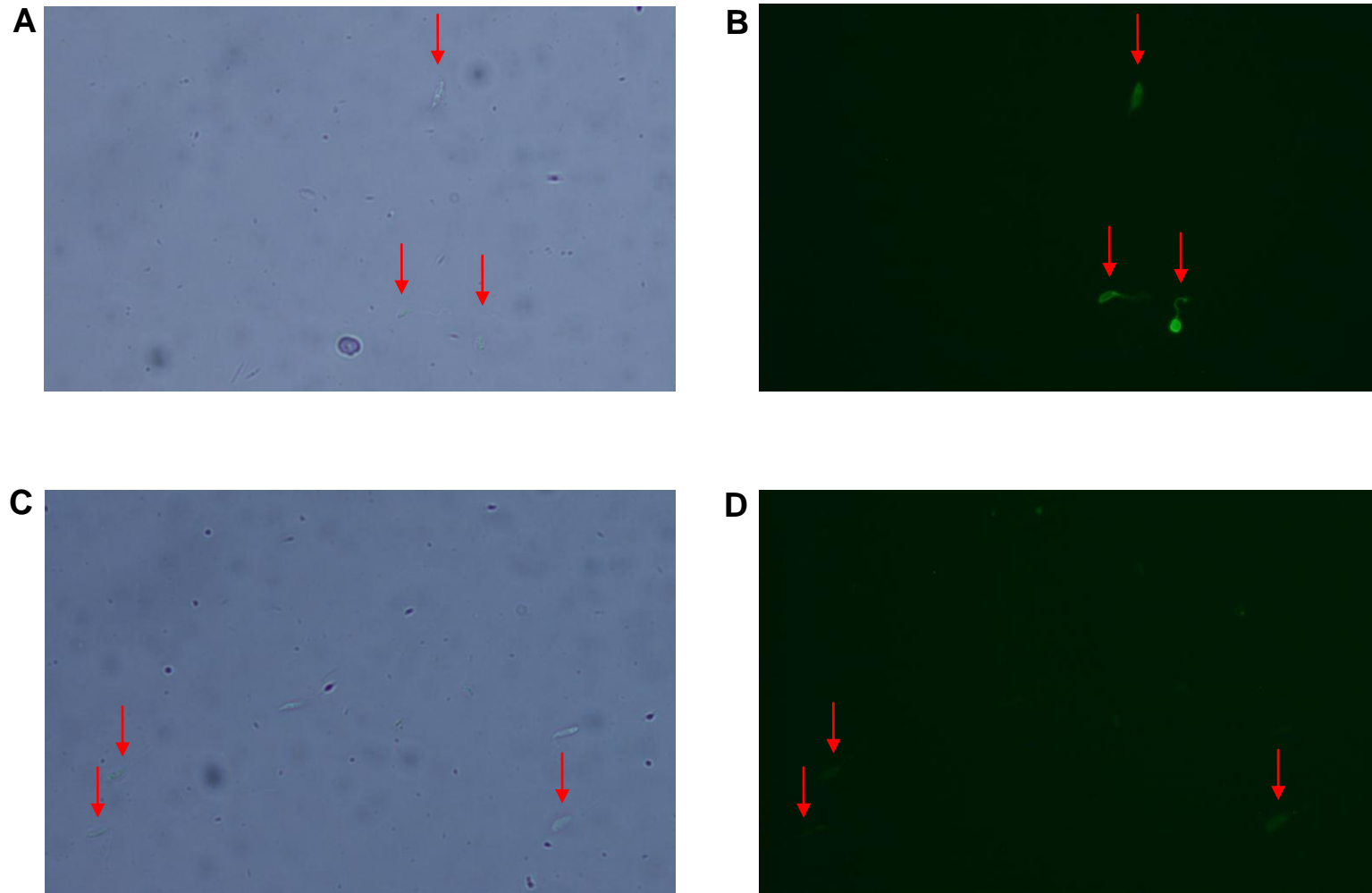
Subpopulação	BG (mediana %)	Lb-Ag (mediana %)	Tg-Ag (mediana %)
CD19 <sup>+</sup>	10,8	9,3	9,5
CD20 <sup>+</sup>	8,8	5,3	6,0
Naive	28,9	5,6	10,4
Memória inicial	12,7	31,8	20,5
Memória	33,4	20,6	21,8
Plasmócitos	15,3	6,2	9,3

Células cultivadas sem estímulo (BG), com antígeno de *L. braziliensis* (Lb-Ag) ou antígeno de *T. gondii* (Tg-Ag). **00**: valores estatisticamente menores que o BG. **00**: valores estatisticamente maiores que o BG.

### 4.3 Influência de anticorpos opsonizantes na atividade anti-*Leishmania* de macrófagos

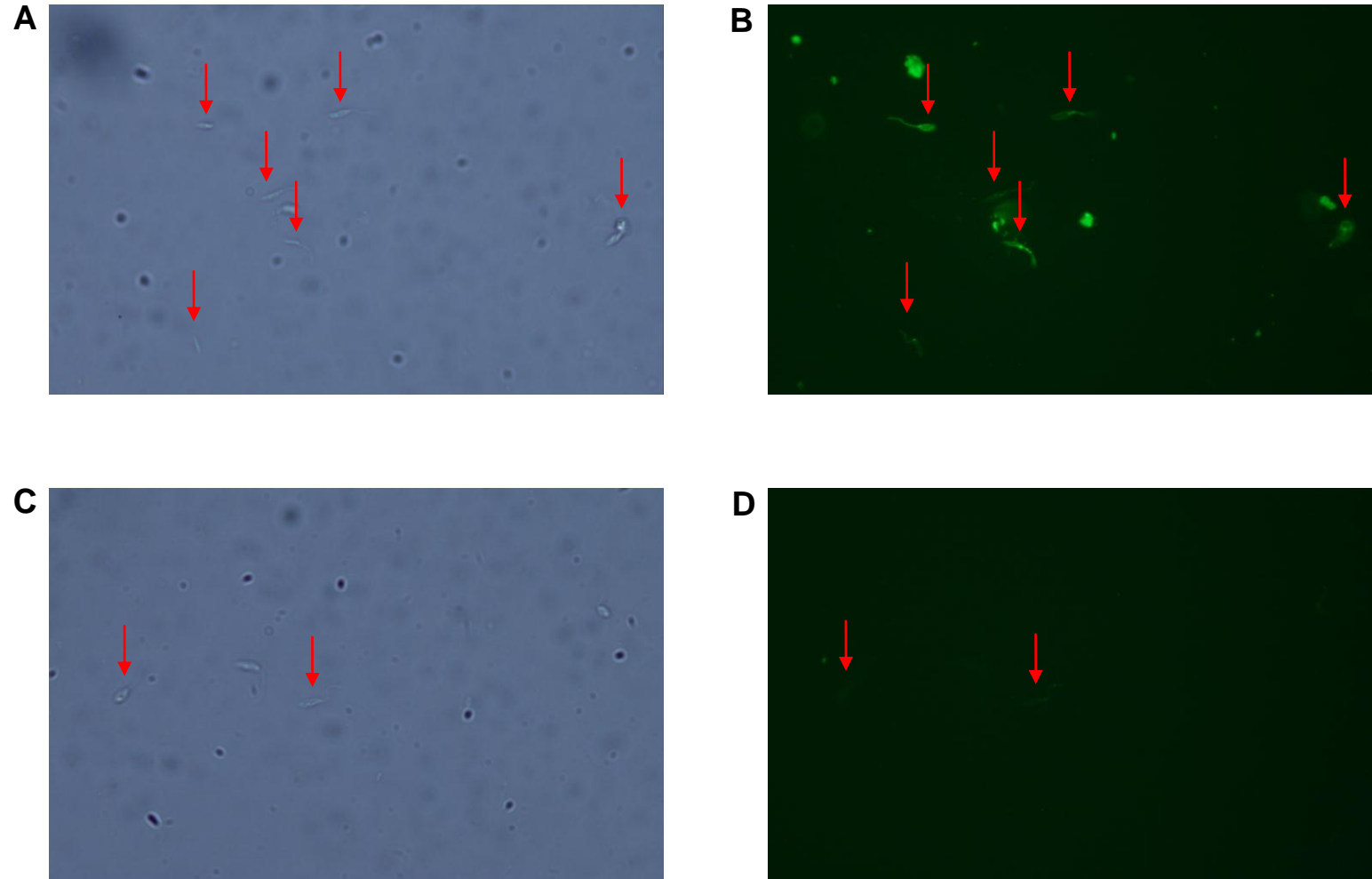
#### 4.3.1 Controle de opsonização de formas promastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* por anticorpos presentes no soro de indivíduo curado de leishmaniose cutânea por imunofluorescência

Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de formas promastigotas de *L. braziliensis* que foram incubadas com soro de indivíduo curado de LC (figura 13) ou indivíduo sem histórico de LC (figura 14) e com conjugado anti-IgG, em campo claro e campo escuro demonstraram que os parasitos foram opsonizados. Foram observadas marcações tanto em promastigotas incubadas com soro diluído 1:5 quanto nas incubadas com soro diluído 1:100.



**Figura 13: Imunofluorescência para controle de opsonização de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* por anticorpos presentes no soro de indivíduo curado de leishmaniose cutânea. Promastigotas de *Leishmania braziliensis* tratadas com soro de indivíduo curado de leishmaniose cutânea diluído 1:5 (A e B) e 1:100 (C e D); imagem em campo claro (A e C) e em campo escuro (B e D). Imagens capturadas após fixação com paraformaldeído 1% e incubação com conjugado anti-IgG. Aumento de 40x. As setas indicam as promastigotas.**





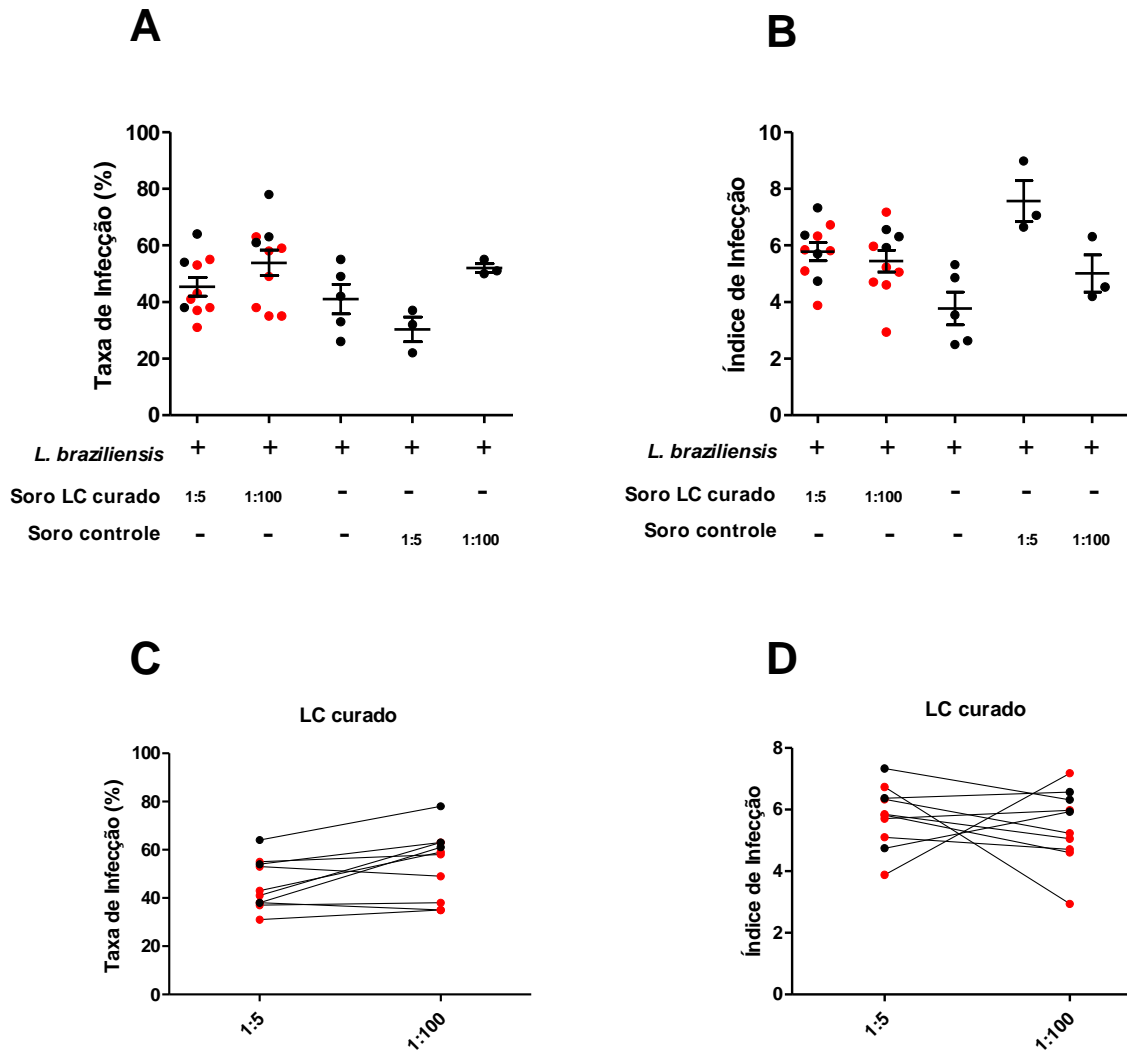
**Figura 14: Imunofluorescência para controle de opsonização de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* por anticorpos presentes no soro de indivíduo sem histórico de leishmaniose cutânea.** Promastigotas de *Leishmania braziliensis* tratadas com soro de indivíduo sem histórico de leishmaniose cutânea diluído 1:5 (A e B) e 1:100 (C e D); imagem em campo claro (A e C) e em campo escuro (B e D). Imagens capturadas após fixação com paraformaldeído 1% e incubação com conjugado anti-IgG. Aumento de 40x. As setas indicam as promastigotas.

#### **4.3.2 Taxa e índice de infecção por promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea em macrófagos**

Quanto à taxa de infecção, não foi observada diferença significativa entre os macrófagos infectados com *L. braziliensis* que não foram incubadas com soro ( $41,0\% \pm 11,7\%$ ; mediana=42%; IQR: 29,5-54,2; n=5) e aqueles infectados com promastigotas que foram tratadas com soro, tanto de indivíduos curados de LC (diluição 1:5 =  $45,4\% \pm 10,4\%$ ; mediana=42,0%; IQR: 37,7-54,2; n=10; diluição 1:100 =  $53,9\% \pm 14,2\%$ ; mediana=58,5%; IQR: 37,2-63,0; n=10), quanto de indivíduos sem histórico de LC (diluição 1:5 =  $45,4\% \pm 10,4\%$ ; mediana=42,0%; IQR: 22,0-37,0; n=3; diluição 1:100 =  $53,9\% \pm 14,2\%$ ; mediana=58,5%; IQR: 50,0-55,0; n=3). Da mesma forma, a taxa de infecção não foi estatisticamente diferente entre os indivíduos curados de LC e o grupo controle, independente da diluição do soro (figura 15A).

Em relação ao índice de infecção, foram observados valores semelhantes entre os macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. braziliensis* que não estiveram em contato com soro ( $3,8 \pm 1,3$ ; mediana=3,5; IQR: 2,6-5,1; n=5) e os macrófagos infectados com parasitos que foram incubados com soro, tanto de indivíduos curados de LC (diluição 1:5 =  $5,8 \pm 1$ ; mediana=5,8; IQR: 5,0-6,4; n=10; diluição 1:100 =  $5,4 \pm 1,2$ ; mediana=5,6; IQR: 4,6-6,4; n=10), quanto do grupo controle (diluição 1:5 =  $7,6 \pm 1,2$ ; mediana=7,0; IQR: 6,6-8,9; n=3; diluição 1:100 =  $5 \pm 1,1$ ; mediana=4,5; IQR: 4,2-6,3; n=3). O índice de infecção também foi estatisticamente semelhante entre os voluntários curados de LC e os voluntários sem histórico de LC (figura 15B).

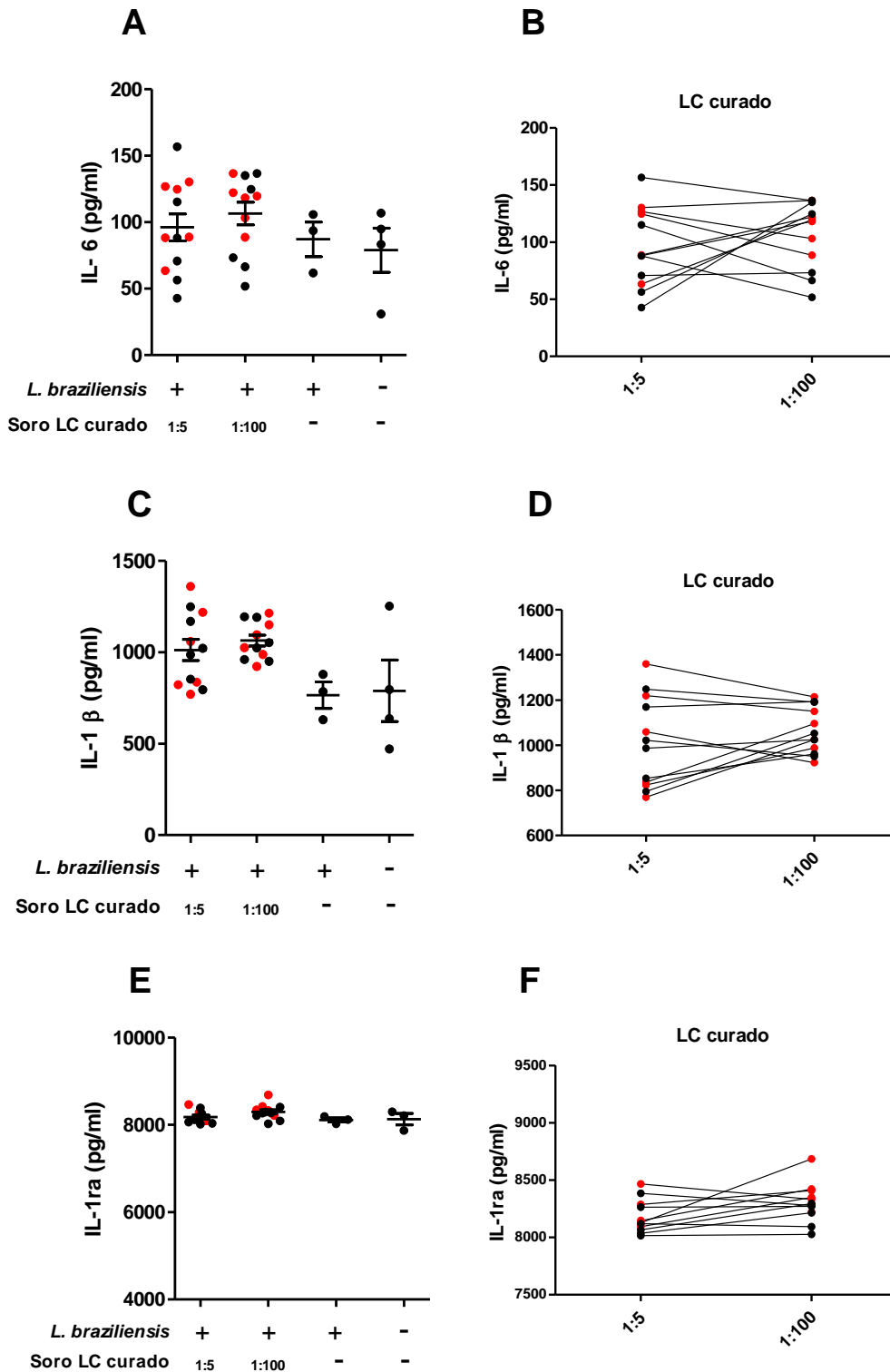
Tanto nos indivíduos curados de LC quanto nos indivíduos sem histórico de LC, a taxa de infecção tende a ser mais elevada nos macrófagos que foram infectados com promastigotas incubadas com soro diluído 1:100 em comparação à diluição de 1:5 (figura 15A), entretanto, esta diferença não é significativa (figura 15C). Os valores de índice de infecção observados foram semelhantes nas duas diluições de soro de voluntários curados de LC (figura 15D), entretanto, no grupo controle foi observada uma tendência a um índice de infecção menor nos macrófagos que foram infectados com *L. braziliensis* que foram incubadas com soro mais diluído (1:100) (figura 15B).



**Figura 15: Taxa e índice de infecção por promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea em macrófagos.** Taxa de infecção (A) de macrófagos infectados por promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* tratada com soro de indivíduos curados de leishmaniose cutânea (LC) com sorologia anti-*Leishmania* positiva (n=7; ●), sorologia anti-*Leishmania* negativa (n=3; ●) ou soro de indivíduos sem histórico de LC (soro controle; n=3) em duas diluições (1:5 e 1:100), ou promastigotas que não foram tratadas com soro. Índice de infecção (B) de macrófagos infectados com promastigotas de *L. braziliensis* nas mesmas condições. Comparação da taxa (C) e do índice de infecção (D) entre as diferentes diluições do soro. As linhas contínuas horizontais em cada grupo representam o valor de mediana e os intervalos interquartis. Utilizados testes estatísticos ANOVA (A e B) e Teste T (C e D). \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001.

#### 4.3.3 Quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea

Os níveis das citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-1ra foram quantificados em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com promastigotas de *L. braziliensis* expostas a soro de indivíduos curados de LC e sem histórico de LC a fim de avaliar se a opsonização influenciaria o grau de ativação destas células.



**Figura 16:** Níveis de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea. Secreção de IL-6 (A), IL-1 $\beta$  (C) e IL-1ra (E) por macrófagos infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* tratada com soro de indivíduos curados de leishmaniose cutânea com sorologia anti-*Leishmania* positiva (n=7; ●) e negativa (n=6; ●) em duas diluições diferentes (1:5 e 1:100), macrófagos infectados por promastigotas que não foram incubadas com soro e macrófagos não infectados. Comparação dos níveis de IL-6 (B), IL-1 $\beta$  (D) e IL-1ra (F) entre as diferentes diluições do soro. As linhas contínuas horizontais em cada grupo representam o valor de mediana e os intervalos interquartis. Utilizados testes estatísticos ANOVA (A, C e E) e Teste T (B, D e F). \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Os níveis de IL-6 foram semelhantes no sobrenadante de cultura dos macrófagos infectados com *L. braziliensis* que não foram incubadas com soro ( $87 \pm 22,7$  pg/mL; mediana=93,5 pg/mL; IQR: 61,8-105,8; n=3) e dos macrófagos infectados com promastigotas tratadas com soro de indivíduos curados de LC (diluição 1:5 =  $96 \pm 34,7$  pg/mL; mediana=88,5 pg/mL; IQR: 65,2-126,3; n=12; diluição 1:100 =  $106,4 \pm 29,5$  pg/mL; mediana=118,9 pg/mL; IQR: 77,1-132,5; n=12), independente da diluição, bem como dos macrófagos que não foram infectados ( $78,9 \pm 33,4$  pg/mL; mediana=89 pg/mL; IQR: 44,0-103,8; n=4) (figura 16A). Não houve diferença estatística significativa nos níveis de IL-6 quando comparada a diluição do soro 1:5 com a diluição 1:100 (figura 16B).

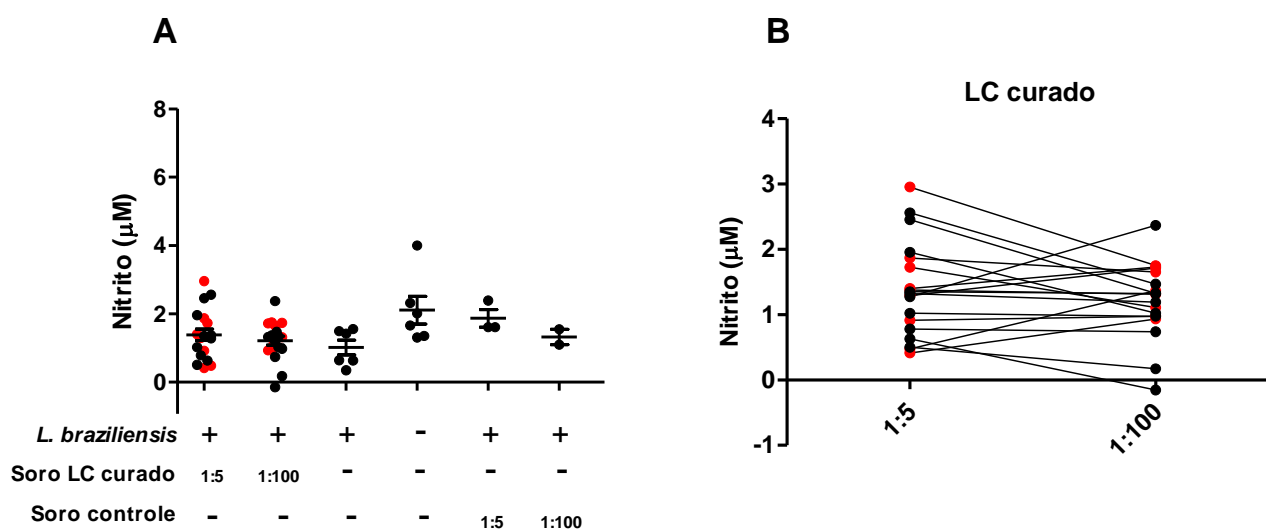
Quanto à dosagem de IL-1 $\beta$ , também não foi observada diferença significativa entre o sobrenadante de cultura dos macrófagos infectados por promastigotas não opsonizadas ( $765,7 \pm 124,9$ ; mediana=786,1; IQR: 631,9-879,2; n=3) e o de macrófagos infectados por *L. braziliensis* opsonizadas por anticorpos de indivíduos curados de LC (diluição 1:5 =  $1012 \pm 201,2$  pg/mL; mediana=1004 pg/mL; IQR: 826,8-1207,0; n=12; diluição 1:100 =  $1064 \pm 103$  pg/mL; mediana=1039 pg/mL; IQR: 967,7-1181,0; n=12), independente da diluição, bem como em relação aos macrófagos não infectados ( $789,9 \pm 336,2$  pg/mL; mediana=717,6 pg/mL; IQR: 513,0-1139,0; n=4) (figura 16C). Entre as duas diluições do soro (1:5 e 1:100) não foi observada diferença significativa nos valores de IL-1 $\beta$  (figura 16D).

A ausência de diferença estatística também foi observada quanto aos níveis de IL-1ra quando comparadas a secreção dos macrófagos infectados por parasitos que não foram tratados com soro ( $8114 \pm 81,1$  pg/mL; mediana=8123 pg/mL; IQR: 8029,0-8180,0; n=3) e a das células infectadas por promastigotas incubadas com soro de indivíduos curados de LC (diluição 1:5 =  $8182 \pm 147,9$  pg/mL; mediana=8128 pg/mL; IQR: 8066,0-8288,0; n=11; diluição 1:100 =  $1064 \pm 103$  pg/mL; mediana=1039 pg/mL; IQR: 8216,0-8393,0; n=12), independente da diluição, bem como em relação aos macrófagos não infectados ( $8130 \pm 226,9$  pg/mL; mediana=8212 pg/mL; IQR: 7873,0-8305,0; n=3) (figura 16E). Não foi observada diferença significativa entre as diluições do soro 1:5 e 1:100 (figura 16F).

O perfil de secreção de IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-1ra foi semelhante entre os grupos com sorologia para *Leishmania* positiva e negativa.

#### 4.3.4 Quantificação de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea

Os níveis de nitrito observados foram estatisticamente semelhantes entre os macrófagos infectados com *L. braziliensis* que não foram opsonizadas por anticorpos ( $1,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ; mediana= $1,0 \mu\text{M}$ ; IQR: 0,5-1,5; n=6) e aqueles infectados com promastigotas que foram incubadas com soro, tanto de indivíduos curados de LC (diluição 1:5 =  $1,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ; mediana= $1,3 \mu\text{M}$ ; diluição; IQR: 0,7-1,8; n=19; 1:100 =  $1,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ; mediana= $1,3 \mu\text{M}$ ; IQR: 0,9-1,6; n=19), quanto de indivíduos sem histórico de LC (diluição 1:5 =  $1,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ; mediana= $1,6 \mu\text{M}$ ; diluição; IQR: 1,6-2,4; n=3; 1:100 =  $1,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ; mediana= $1,3 \mu\text{M}$ ; IQR: 1,1-1,5; n=2), independente da diluição (figura 17A).



**Figura 17:** Níveis de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* expostas ao soro de pacientes curados de leishmaniose cutânea. Produção de nitrito por macrófagos infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* tratada com soro de indivíduos curados de leishmaniose cutânea (LC) com sorologia anti-*Leishmania* positiva (n=9; ●) e negativa (n=10; ●) em duas diluições diferentes (1:5 e 1:100), macrófagos infectados por promastigotas tratadas com soro de indivíduos sem histórico de LC (1:5 e 1:100), macrófagos infectados por promastigotas que não foram incubadas com o soro e macrófagos não infectados. Comparação dos níveis de nitrito entre as diluições do soro dos indivíduos curados de LC (B). As linhas contínuas horizontais em cada grupo representam o valor de mediana e os intervalos interquartis. Utilizados testes estatísticos ANOVA (A) e Teste T (B). \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Não foi observada diferença estatística significativa entre os níveis de nitrito dos indivíduos curados de LC e dos sem histórico de LC (figura 17A). Também não houve diferença estatística quando comparadas as duas diluições do soro (1:5 e 1:100) dos voluntários curados de LC (figura 17B).

O perfil de produção de nitrito foi semelhante entre os grupos com sorologia para *Leishmania* positiva e negativa.

## 5 DISCUSSÃO

O conhecimento a respeito da imunopatogênese e imunoproteção da LTA tem sofrido alguns avanços ao longo dos anos. Entretanto, ainda se faz necessário um progresso na obtenção de melhores ferramentas que possam ser eficazes no controle do número de casos da doença e na predição do prognóstico. Nesse sentido, o desenvolvimento de uma vacina capaz de proteger os indivíduos que vivem em áreas endêmicas seria de grande valia. Assim como a definição de biomarcadores capazes de prever a reativação da doença e a evolução para formas mais graves seria de grande importância. No entanto, ainda há uma grande lacuna de conhecimento sobre a resposta imune duradoura responsável pelo controle da leishmaniose em indivíduos que evoluíram para a cura clínica e os mecanismos imunológicos que desencadeiam recidivas e o agravamento da doença. Apesar disso, trabalhos que tem como enfoque a cura da leishmaniose tegumentar tendem a avaliar apenas a fase inicial de cicatrização da lesão pós-tratamento. Entretanto, já foi sugerido que o equilíbrio da resposta imune associada à proteção na LC é alcançado somente após dois anos do contato inicial com o antígeno de *Leishmania* (Fagundes-Silva et al. 2012, Pereira-Carvalho et al. 2013), apontando a necessidade da realização de estudos que tenham como alvo a resposta imune gerada após a fase inicial da cura.

Também é importante ressaltar que o conhecimento sobre a imunopatogênese e imunoproteção da LTA tem sido baseado principalmente na resposta de linfócitos T, uma vez que existe um paradigma de que a resposta humoral não desempenha um papel relevante na infecção por *Leishmania*. Contudo, já existem evidências da participação de linfócitos B e anticorpos na resposta imune frente à infecção por parasitos intracelulares, inclusive por *L. major* (Su et al. 1997, Mastroeni et al. 2000, Woelbing et al. 2006). Gutierrez e colaboradores (1991) observaram que os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* podem variar de acordo com a carga parasitária, o tempo de exposição à doença, a forma clínica e o perfil de resposta imune induzida pelo parasita. A correlação positiva entre o declínio dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e a cura clínica da LTA já foi descrita por alguns autores (Delgado et al. 1996, Amato et al. 1998, Brito et al. 2001). Como os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* tendem a diminuir após o controle favorável da LTA, é provável que a resposta humoral possa ser utilizada como um indicador para auxiliar o acompanhamento clínico após a cicatrização das lesões, apesar do papel



das imunoglobulinas na LTA não ser bem compreendido ainda (Mendonça et al. 1988, Brito et al. 2001, Castellano et al. 2009).

As subclasses de IgG também já foram mencionadas como possíveis biomarcadores. Um estudo com pacientes de leishmaniose visceral observou que seis meses após o tratamento os níveis de IgG1 específicos permaneceram elevados em indivíduos que apresentaram falha terapêutica, por outro lado, esses níveis decaíram nos indivíduos que obtiveram a cura, demonstrando que esta subclasse pode ser um potencial biomarcador de falha terapêutica na leishmaniose visceral (Bhattacharyya et al. 2014). Fagundes-Silva e colaboradores (2012) observaram que os títulos de IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* de indivíduos com LC decaíram após a cura clínica, mostrando que a detecção no soro das subclasses de IgG anti-*Leishmania* pode ser uma ferramenta importante para o acompanhamento clínico após a cicatrização da lesão. Diante deste fato, este trabalho investigou se indivíduos curados de LC, os que mantêm sorologia anti-*Leishmania* positiva e os que apresentam sorologia negativa, diferem entre si no que diz respeito à resposta humoral, tanto fenotipicamente, através da determinação da frequência das subpopulações de linfócitos B, quanto funcionalmente, pela avaliação da influência de anticorpos opsonizantes sobre a atividade anti-*Leishmania* de macrófagos. Também foi investigado se estes anticorpos são provenientes de plasmócitos circulantes em sangue periférico.

A produção de imunoglobulinas após a cura clínica pode ser realizada por plasmócitos recém-ativados pelo estímulo antigênico, encontrados no sangue periférico, ou por plasmócitos de vida longa presentes na medula óssea. Raqib e colaboradores (2004) demonstraram que um sistema de detecção de anticorpos produzidos a partir de plasmócitos recém-ativados provenientes do sangue periférico, denominado ALS (do inglês “antibody lymphocytes secretion”) pode ser utilizado para detecção de tuberculose subclínica em indivíduos assintomáticos. Uma vez que existe um processo infeccioso em atividade, antígenos do parasito são constantemente liberados e contribuem para manter ativas populações de linfócitos B, as quais circulam através do sangue periférico. Esse processo de ativação também contribui para geração de plasmócitos que produzem imunoglobulinas que podem ser dosadas em sobrenadante de cultura de PBMC. No estudo apresentado nesta dissertação, observamos que os níveis de IgG1 e IgG3 em sobrenadante de cultura não correlacionam com os títulos observados nas amostras de soro dos mesmos indivíduos, sugerindo que as células responsáveis

pela produção dos anticorpos remanescentes no plasma não são exclusivamente plasmócitos do sangue circulante. Outras células, como por exemplo, plasmócitos de vida longa localizados em outros compartimentos anatômicos, como a medula óssea, provavelmente contribuem para a manutenção de imunoglobulinas específicas no plasma de indivíduos clinicamente curados por longos períodos de tempo.

Em relação à dosagem de IgG3 anti-*Leishmania*, a maioria dos indivíduos apresentou uma produção desta subclasse acima do valor de corte, fenômeno este que foi observado tanto em sobrenadante de culturas de células que foram cultivadas na ausência de estímulo antigênico (90% [27/30]), quanto no sobrenadante de cultura de células que foram estimuladas com Lb-Ag (53% [16/30]). Apesar de alguns indivíduos não apresentarem plasmócitos circulantes com capacidade de produção de IgG3 acima do *cut off*, de maneira geral este padrão de produção se apresenta de forma homogênea, tanto em células estimuladas quanto em não estimuladas, exceto por um único indivíduo, que apresenta uma dosagem desta imunoglobulina após o estímulo antigênico bem mais elevada do que os demais.

Quanto à produção por plasmócitos circulantes de IgG1 anti-*Leishmania*, o grupo de indivíduos que apresenta valores acima do *cut off* é bem menor, tanto para as culturas estimuladas quanto não estimuladas com antígeno de *Leishmania* (20% [6/30]). Diferente do que ocorre para IgG3, o grupo dos indivíduos portadores de células secretoras de IgG1 em sobrenadante de cultura se distingue melhor do grupo que não apresenta essas células (figura 3A). Esta diferença no padrão de produção de IgG1 e IgG3 após a cura levanta a hipótese de que talvez uma das duas subclasses reflita melhor o que de fato ocorre na clínica, e que talvez esta subclasse contribua para a predição do prognóstico da doença. Se este for o caso, é possível que IgG1 anti-*Leishmania* seja a subclasse de imunoglobulina capaz de representar melhor o curso clínico da doença, uma vez que foi observado um grupo bem definido de indivíduos que mantêm sua produção elevada mesmo anos após a cura. Este fato sugere que talvez IgG1 possa ser um biomarcador capaz de prever a evolução da doença para a forma mucosa, uma vez que em pacientes de LM são registrados elevados níveis de imunoglobulinas (Junqueira Pedras et al. 2003). Bhattacharyya e colaboradores (2014) já sugeriram a utilização da IgG1 como biomarcador para falha terapêutica na leishmaniose visceral. Neste trabalho todas as subclasses de IgG foram dosadas no soro de pacientes de LV, entretanto

somente IgG1 apresentou níveis expressivamente elevados após seis meses de tratamento nos indivíduos que evoluíram para falha terapêutica, o que demonstra que, neste caso, os níveis IgG1 refletiram melhor do que os das outras subclasses o que estava ocorrendo clinicamente com estes pacientes (Bhattacharyya et al. 2014).

Foi observado, tanto para IgG1 quanto para IgG3, que o estímulo das PBMC com antígenos de *Leishmania* não induziu aumento na produção de imunoglobulinas específicas, como era esperado. Esse fenômeno pode ter ocorrido devido à ligação entre anticorpos secretados pelos plasmócitos e os antígenos utilizados para estimular as células, impossibilitando que parte dos anticorpos secretados *in vitro* fosse detectada no teste ELISA. Por outro lado, foi observada uma tendência a uma redução, induzida pelo estímulo antigênico, no percentual de plasmócitos avaliados pela citometria de fluxo, o que poderia refletir nesta secreção diminuída de imunoglobulinas. Entretanto, esta tendência à redução do número de plasmócitos foi observada após cinco dias de cultura, e a diminuição na secreção de IgG1 e IgG3 foi vista após três dias de cultura. Portanto, avaliar se ao terceiro dia de cultura já é possível observar esta tendência à redução na frequência de plasmócitos poderia contribuir para esclarecer se pode existir alguma conexão entre estes dois fenômenos observados.

É importante ressaltar que indivíduos com níveis séricos de IgG1 e IgG3 negativos apresentaram produção destas imunoglobulinas no sobrenadante de culta. Este fato sugere que estes indivíduos possuem plasmócitos circulantes com capacidade de produção de anticorpos específicos, entretanto, não em valores detectáveis no soro, talvez devido à frequência destas células não ser elevada nestes indivíduos. A utilização de testes sorológicos para diagnóstico da LC é bastante questionável, uma vez que existem relatos de reações falso negativas, além de reatividade cruzada para outras doenças. Entretanto, pelo que foi observado neste estudo, é possível que a quantificação de anticorpos no sobrenadante de cultura reflita melhor o que ocorre na clínica, podendo assim ser uma potencial ferramenta diagnóstica.

As funções imunológicas dos linfócitos B têm sido investigadas ininterruptamente em modelos de doenças associadas à resposta imune, fundamentalmente às doenças autoimunes (Maecker et al. 2012). Com isso, uma expressiva quantidade de novas informações a respeito desse subtipo de linfócito tem sido acumulada, principalmente em relação à caracterização fenotípica de novas subpopulações e funções de células B. Através de ensaios citofluorimétricos,

por meio de marcações de moléculas de superfície CD19, CD38 e IgD, uma importante classificação de células B maduras tem sido utilizada na caracterização fenotípica/funcional destas células. É possível distinguir cinco subpopulações de linfócitos B em estágios de diferenciação com início em Bm1 (*naive*) e término em Bm5 (memória). Bohnhorst e colaboradores (2001) observaram que estas subpopulações de linfócitos B em indivíduos saudáveis estão circulantes em sangue periférico, e em equivalência proporcional quando comparadas com o compartimento linfóide secundários (ex. tonsila). A partir da análise da frequência destas subpopulações, Binar e colaboradores (2008) sugeriram a utilização do perfil destes linfócitos B para auxiliar o diagnóstico da síndrome de Sjögren, baseado na observação de que, em portadores desta síndrome, a porcentagem de células Bm2 e Bm2' é aumentada em comparação ao observado em pacientes com artrite reumatoide e com lúpus eritematoso sistêmico, enquanto que a porcentagem das células Bm5 e Bm5 inicial é reduzida em relação a estas, demonstrando que este perfil de células pode contribuir para a diferenciação da síndrome de Sjögren de outras síndromes autoimunes reumáticas. Estes dados suportam a estratégia de investigação do perfil fenotípico/funcional de linfócitos B, tendo como amostra clínica o sangue periférico.

Linfócitos B circulantes já foram sugeridos como biomarcadores de infecção ativa por *M. tuberculosis* (Sebina et al. 2014). Ao avaliar a frequência de plasmoblastos e células B de memória em sangue periférico através de ensaios de *Enzyme-Linked ImmunoSpot* (ELISPOT), Sebina e colaboradores (2014) observaram que as frequências destas populações de linfócitos B em indivíduos com evidências de tuberculose latente foram mais elevadas do que nos indivíduos que não apresentaram evidências de tuberculose latente, sugerindo que a proporção destas células pode ser útil como um biomarcador da infecção pela micobactéria.

Em nosso estudo avaliamos o perfil das subpopulações de linfócitos B, *naive*, de memória inicial, de memória e plasmócitos em indivíduos curados de LC, e se estas subpopulações apresentavam diferentes porcentagens se comparados os grupos previamente estabelecidos como tendo sorologia anti-*Leishmania* positiva ou negativa. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos ( $p > 0,05$ ) nos percentuais de nenhuma das subpopulações avaliadas. Entretanto, era esperado que houvesse alguma diferença entre os dois grupos, pelo menos quanto ao percentual de plasmócitos, uma vez que as demais subpopulações de linfócitos B não possuem muita relação com a produção de imunoglobulinas. Como esta

avaliação foi realizada em sangue periférico, é provável que outros tipos celulares, como plasmócitos de vida longa, estejam envolvidos nesta produção de anticorpos anti-*Leishmania* em quantidade suficiente para ser quantificada no soro de indivíduos curados de leishmaniose há longo tempo.

Em relação à estimulação antigênica, foi observado que esta induziu uma redução significativa na porcentagem de células *naive*, fenômeno que é esperado numa resposta antígeno específica, porém não nessa proporção. É provável que este fenômeno tenha ocorrido também de forma inespecífica, em vista do percentual de células que deixaram de ser *naive*. É possível que, parte destas células fosse específica a outros antígenos, porém as condições criadas *in vitro* foram capazes de induzir a ativação destas células, através de citocinas ou o auxílio de linfócitos T (figura 9). Fato que corrobora esta questão é a observação de que no grupo controle pode ser observada uma tendência à redução nestas células *naive* após a estimulação antigênica, possivelmente devido a uma ativação inespecífica.

Por outro lado, após a estimulação antigênica, a frequência de células B de memória inicial aumentou significativamente (figura 10), sugerindo que após a ativação os linfócitos B *naive* provavelmente se diferenciaram em células B de memória inicial (Kaminski et al. 2012). Também em relação a este fenômeno é possível que ativações inespecíficas tenham influenciado. Outro fato observado foi a tendência à redução na porcentagem de plasmócitos após o estímulo antigênico com Lb-Ag ( $p = 0,056$ ), além da redução significativa destas células após estimulação com Tg-Ag ( $p = 0,043$ ), o que não era esperado, uma vez que células ativadas tendem à proliferar. Entretanto, esta observação vai de encontro à redução na produção de imunoglobulinas específicas por plasmócitos circulantes após a estimulação antigênica observada neste estudo. Porém, é possível que esteja ocorrendo a morte destas células devido ao tempo de cultura de cinco dias, o que faz necessária a realização de um ensaio de cinética para verificar se a redução no percentual de plasmócitos após o estímulo antigênico está relacionada ao tempo de cultura.

Estudos demonstraram que a opsonização de *Leishmania* por imunoglobulinas específicas podem contribuir para mecanismos de evasão desse parasito (Pleass & Woof 2001, Miles et al. 2005, Buxbaun 2008). Por outro lado, estudos em modelos experimentais com animais deficientes em produzir IgG atribuem às imunoglobulinas o papel de resistência à infecção por *Leishmania* (Kima et al. 2000).

As informações na literatura a respeito do papel de anticorpos na resposta à infecção por *Leishmania* ainda são escassas. Entretanto, em outros modelos de infecção com patógenos intracelulares já foram descritos resultados interessantes. Kumar e colaboradores (2015) demonstraram que a opsonização de *M. tuberculosis* por anticorpos presentes no soro de indivíduos que não desenvolveram sintomas de tuberculose, porém apresentaram altos títulos de imunoglobulinas contra antígenos da micobactéria, promoveu um aumento na captação e morte do bacilo pelos macrófagos. Estes resultados nos fazem questionar se o soro de indivíduos assintomáticos de leishmaniose também teriam anticorpos capazes de aumentar a capacidade microbicida do macrófago. Em nosso estudo avaliamos se a opsonização de formas promastigotas de *L. braziliensis* por anticorpos presentes no soro de indivíduos curados de LC com sorologia positiva e negativa interfere na atividade anti-*Leishmania* de macrófagos.

Não foi observada diferença significativa na taxa de infecção entre os macrófagos infectados por promastigotas expostas ao soro, tanto de indivíduos curados quanto sem histórico de LC, independente da quantidade de anticorpos opsonizantes, e os macrófagos infectados por promastigotas que não foram tratadas com soro, sugerindo que a presença de anticorpos opsonizantes não tem influência na atividade fagocítica/microbicida do macrófago. Entretanto, vale ressaltar que estes macrófagos são provenientes de monócitos de linhagem THP-1, e foi vista uma heterogeneidade morfológica dos macrófagos observados nas lâminas (figura 4), sugerindo uma heterogeneidade funcional destes macrófagos, que talvez possa interferir na capacidade fagocítica/microbicida destas células, independente da presença do anticorpo ou não. Uma vez que esta linhagem precisa ser tratada com droga para se diferenciar em macrófago, é possível que esta heterogeneidade esteja refletindo distintos estágios de diferenciação.

Outra questão importante é a diversidade de antígenos de superfície da *Leishmania* que podem ser reconhecidos por diversos anticorpos, que ao se ligarem a diferentes receptores presentes na superfície dos macrófagos podem gerar sinais distintos, tanto de ativação quanto de inibição. Além disso, é possível que os anticorpos presente no soro do indivíduo, e que foram utilizados para opsonizar as *Leishmanias*, não sejam específicos para antígenos de superfície da promastigota, impossibilitando assim a opsonização. O fato de não termos observado diferenças funcionais decorrentes da presença ou não de anticorpos

neutralizantes/opsonizantes pode ter sido em função de um ou mais fatores associados que foram anteriormente citados.

Em relação ao controle de opsonização das promastigotas, a marcação de IgG aderida a superfície da *Leishmania*, foi possível observar que a exposição ao soro de indivíduo curado de LC diluído em 1:5, teve uma intensidade de marcação maior quando comparado a diluição 1:100. Entretanto, nas promastigotas expostas ao soro de indivíduo sem histórico de LC, também foi possível observar marcação das *Leishmanias* nas duas diluições, o que nos faz questionar se estas diluições seriam realmente as ideais para ser utilizada neste ensaio. Acredita-se na possibilidade de que na diluição 1:5 o soro estivesse muito concentrado, levando à interações inespecíficas, e que na diluição 1:100 estivesse diluído a ponto de não ocorrer mais o efeito opsonizante, sendo este o motivo de não vermos diferença entre o indivíduo curado e o controle na imunofluorescência, assim como não foi observada nenhuma diferença em relação às duas diluições em nenhum dos parâmetros analisados neste ensaio.

A produção das citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-1ra no sobrenadante de cultura dos macrófagos foi semelhante entre os que foram infectados por promastigotas expostas ao soro diluído 1:5, ao soro diluído 1:100 e por promastigotas que não foram opsonizadas, sugerindo que a opsonização não interferiu na produção de citocinas inflamatórias por estes macrófagos. Não foi observada diferença significativa entre os grupos como sorologia positiva e negativa ( $p>0,05$ ) em relação a nenhum dos fatores analisados no sobrenadante de cultura de macrófagos.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os pacientes curados de LC que mantêm sorologia positiva e os apresentam sorologia negativa para antígenos de *Leishmania* são semelhantes entre si fenotipicamente, no que diz respeito às subpopulações de linfócitos B de sangue periférico, e funcionalmente, no que diz respeito à influência de anticorpos opsonizantes na atividade anti-*Leishmania* de macrófagos, bem como em relação à capacidade de produção de IgG1 e IgG3 por plasmócitos do sangue circulantes. Adicionalmente, foi observado que estes anticorpos remanescentes no plasma provavelmente não foram produzidos somente por plasmócitos recém-ativados circulantes em sangue periférico, mas também por outras populações celulares.

Contudo, fica clara a necessidade de novos estudos sobre a resposta humoral, uma vez que o preenchimento das lacunas de conhecimento sobre a atividade de linfócitos B e anticorpos na infecção por *Leishmania* pode contribuir

para o entendimento da imunopatogenia da LC, sobretudo daqueles casos que ao longo do tempo pós-tratamento apresentam reativação da doença ou que evoluem para a forma clínica de maior gravidade. Além disso, entender como o linfócito B participa no controle do parasito pode nos auxiliar na definição de novos biomarcadores associados com o prognóstico, assim como no estabelecimento de novas estratégias terapêuticas e de imunoprofilaxia.



## 6 CONCLUSÕES

- Linfócitos B circulantes de indivíduos curados de LC são capazes de produzir anticorpos IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania in vitro*, porém esta capacidade não está correlacionada com a dosagem sérica dessas imunoglobulinas, sugerindo que outras células, como por exemplo plasmócitos de vida longa, provavelmente contribuem para a manutenção de imunoglobulinas específicas no plasma de indivíduos clinicamente curados por longos períodos de tempo.

- O perfil imunofenotípico das subpopulações de linfócitos B é estatisticamente semelhante entre indivíduos que apresentam sorologia anti-*Leishmania* positiva e negativa após a cura clínica da LC, bem como não é diferente entre os indivíduos curados há longo tempo e os indivíduos sem histórico de LC.

- Indivíduos curados de LC que apresentam sorologia anti-*Leishmania* positiva e negativa não diferem entre si no que diz respeito à resposta de macrófagos à infecção por *L. braziliensis* opsonizada. A presença de anticorpos opsonizantes parece não influenciar a atividade anti-*Leishmania* de macrófagos no que diz respeito à fagocitose, produção de nitrito e secreção de citocinas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pilay S. Ativação das células B e produção de anticorpos. In: Abbas, AK, Imunologia celular e molecular. 7 ed. Elsevier. 2012. p. 243-268.
- Amato VS, Duarte MI, Nicodemo AC, de Carvalho LV, Pagliari C, da Matta VL, de Oliveira LS, de Castro SM, Uip DE, Amato JG, Amato Neto V. An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998;40:23-30.
- Amato VS, Padilha AR, Nicodemo AC, Duarte MI, Valentini M, Uip DE, Boulos M, Neto VA. Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: a pilot study. *Int J Infect Dis*. 2000. 4:153-157.
- Amato VS, Andrade HF, Duarte MI. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop*. 2003. 85:39-49.
- Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive Tregulatory cells in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2010. 125:1114–24e8.
- Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*. 2002. 70:6734-740.
- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2009. 200:75–78.
- Banerjee A, Bhattacharya P, Joshi AB, Ismail N, Dey R, Nakhasi HL. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. *Cell Immunol*. 2016.
- Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 1995. 17: 21-28.
- Bhattacharyya, T., Ayandeh, A., Falconar, A. K., Sundar, S., El-Safi, S., Gripenberg, M. A., & Ahmed, O. IgG1 as a potential biomarker of post-chemotherapeutic relapse in visceral leishmaniasis, and adaptation to a rapid diagnostic test. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014. 8(10), e3273.
- Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol*. 2006. 126:15-24.
- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the

skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*. 2001. 194: 1497-1506.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002 420:502-507.

Bertho AL, Santiago MA, Da-Cruz AM, Coutinho SG. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 2000. 33:317-325.

Bi Y, Liu G, Yang R. Th17 cell induction and immune regulatory effects. *J Cell Physiol*. 2007. 211:273-278.

Binard A, Le Pottier L, Devauchelle V, Saraux A, Youinou P, Pers JO. Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjögren syndrome? *Ann Rheum Dis*. 2008. **68**: 1447–52.

Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007. 102:625-630.

Bittencourt AL, Barral A, Costa JM, Saldanha AC, Badaró F, Barral-Netto M, Freitas LA. Diffuse cutaneous leishmaniasis with atypical aspects. *Int J Dermatol*. 1992. 31:568-70.

Boaventura VS, de Oliveira JG, Costa JM, Novais FO, de Oliveira CI, Barral-Netto M, Barral A. The value of the otorhinolaryngologic exam in correct mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2009. 81(3):384-6.

Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Barral A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur Immunol*. 2010. 40:2830-2836.

Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol*. 2001. 1;167(7):3610-8.

Bomfim G, Andrade BB, Santos S, Clarêncio J, Barral-Netto M, Barral A. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *Am J Trop Med Hyg*. 2007. Nov;77(5):854-9.

Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E, Tacchini-Cottier F, Couppie P, Launois P. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun*. 2009. 77:1465-1474.

- Brasil, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2013.
- Brelaz-de-Castro MC, de Almeida AF, de Oliveira AP, de Assis-Souza M, da Rocha LF, Pereira VR. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol*. 2012. 279: 180-186.
- Brito MEF, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001. 95:203-6.
- Brodskyn CI, Barral A, Boaventura V, Carvalho E, Barral-Netto M. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol*. 1997. 159:4467-4473.
- Buxbaum LU. A detrimental role for IgG and FcγR in *Leishmania mexicana* infection. *Immunol*. 2008. Res 42:197-209.
- Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, Goncalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva JS. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis*. 2006. 193:1313-1322.
- Carneiro FP, De Magalhães AV, De Jesus Abreu Almeida Couto M, Bocca AL, Muniz-Junqueira MI, Ribeiro Sampaio RN. Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2009. 31:646-651.
- Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, Rocha H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol*. 1985. 135(6):4144-8.
- Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1995. 53:273-277.
- Casadevall A. Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: twodimensional thinking comes full circle. *Infect Immun*. 2003. 71(8):4225-4228.
- Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A, Rodrigues V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol*. 2009. 70:383-390.
- Castes M, Agnelli A, Verde O, Rondón AJ. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Immunol* . 1983. 27:176-186.

- Chan J, Mehta S, Bharrhan S, Chen Y, Achkar JM, Casadevall A & Flynn J. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. In *Seminars in immunology*. 2014. Vol. 26, No. 6, pp. 588-600. Academic Press.
- Conceição-Silva F, Dórea RC, Pirmez C, Schubach A, Coutinho SG. Quantitative study of *Leishmania braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1990. 79:221-226.
- Correale J, Farez M, Razzitte G. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann. Neurol*. 2008. 64:187–99.
- Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonça SC, Bertho AL, Soong L, McMahon-Pratt D. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol*. 1996. 84:144-155.
- Culkin SJ, Rhinehart-Jones T, Elkins KL. A novel role for B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS. *J Immunol*. 1997. 158 (7):3277–3284
- Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994. 62:2614-2618
- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002. 9:251-256.
- Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose tegumentar Americana. In: Coura JR, org. *Dinâmica das Doenças Infecciosas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005. p.1-16.
- Da-Cruz AM, Oliveira-Neto MP, Bertho AL, Mendes-Aguiar CO, Coutinho SG. T cells specific to *Leishmania* and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. *J Invest Dermatol* 2010. 130:1329-1336.
- Delgado O, Guevara P, Silva S, Belfort E, Ramirez JL. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1996. 55:267-72.
- De-Campos SN, Souza-Lemos C, Teva A, Porrozzi R, Grimaldi G Jr. Systemic and compartmentalised immune responses in a *Leishmania braziliensis*-macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010. 137:149-154.
- De Souza MA, da Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto SJ, Ferreira MS. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in American tegumentary leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005. 38:137-41.

- Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J. Clin. Investig.* 1996. 97:2063–73.
- Fagundes-Silva GA, Vieira-Gonçalves R, Nepomuceno MP, de Souza MA, Junior SF, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol.* 2012. 28:1365-3024.
- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa Jr J, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun.* 2005. 73:7853-7859.
- Faria DR, Souza PE, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009. 31:432-439.
- Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis.* 2002. 34:E54-58.
- Gomes-Silva A, Bittar RC, Nogueira RS, Amato VS, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. Can IFN- $\gamma$  and IL-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol.* 2007. 149(3):440-4.
- Gomes-Silva A, Pereira-Carvalho R, Fagundes-Silva G, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM. Homeostasis of specific immune response in clinically cured cutaneous leishmaniasis subjects due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009. 42 (Suppl II):130-1333.
- Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, Carvalho LP, et al. IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following *Leishmania major* Infection. *PLoS Pathog.* 2013. 9(3):e1003243.
- Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderraa LB, Santrich CV, Saravia NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1991. 45:281-9.
- Harris, D. P., L. Haynes, P. C. Sayles, D. K. Duso, S. M. Eaton, N. M. Lepak, L. L. Johnson, S. L. Swain, and F. E. Lund. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* 2000. 1: 475–482.
- Junqueira-Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VMA, Rabelo A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003. 47:477-485.

- Jury EC, Eldridge J, Isenberg DA, Kabouridis PS. Agrin signalling contributes to cell activation and is overexpressed in T lymphocytes from lupus patients. *J. Immunol.* 2007. 179:7975–83.
- Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF & Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Frontiers in immunology.* 2012. 3, 302.
- Kariminia A, Bourreau E, Pascalis H, Couppié P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F, Launois P. Transforming growth factor beta 1 production by CD4+ CD25+ regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects stimulated with *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun.* 2005. 73:5908-5914.
- Kima PE et al. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 2000. 191(6):1063–1068
- Klein U, Kuppers R and Rajewsky K. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood.* 1997.89:1288.
- Kozakiewicz L, Phuah J, Flynn J, Chan J. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Adv Exp Med Biol.* 2013.783:225-50.
- Kropf, Pascale, et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *The FASEB journal.* 2005. 19.8:1000-1002.
- Kumar SK, Singh P & Sinha S. Naturally produced opsonizing antibodies restrict the survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages by augmenting phagosome maturation. *Open biology.* 2015. 5(12), 150171.
- Langhorne J et al. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1998. 95(4):1730–1734.
- Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 2003. 11:210-214.
- Li JS, Winslow GM. Survival, replication, and antibody susceptibility of *Ehrlichia chaffeensis* outside of host cells. *Infect Immun.* 2003. 71(8):4229–4237.
- Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol.* 2009.182(5):3039-46.
- Machado P, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis.* 2002. 34:E69-73.
- Maecker HT, McCoy JP & Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nature Reviews Immunology.* 2012. 12(3), 191-200.

- Malissen B. Revisiting the follicular helper T cell paradigm. *Nature immunology*. 2009. 10(4), 371-372.
- Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2007. 178(6):3447–56.
- Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trend Cell Biol*. 2005.15(11):599-607.
- Maspi N, Abdoli A & Ghaffarifar F. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathogens and Global Health*. 2016. 110(6), 247-260.
- Mastroeni P, Simmons C, Fowler R, Hormaeche CE, Dougan G. Igh-6(-/-) (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium and show impaired Th1 T-cell responses to *Salmonella* antigens. *Infect Immun*. 2000. 68: 46-53.
- Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*.2012. 30:221-41.
- Melby PC, Tabares A, Restrepo BI, Cardona AE, McGuff HS, Teale JM. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol*. 2001. 99: 17-25.
- Mendes-Aguiar CO, Gomes-Silva A, Nunes E Jr, Pereira-Carvalho R, Nogueira RS, Oliveira-Neto Mde P, Bertho AL, Da-Cruz AM. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by *Leishmania* antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 2009. 157:377-384.
- Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med*. 2004. 200:201-210.
- Mendonça SCF, Sousa WJS, Nunes MP, Marzochi MCA, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in new world leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988. 83:347-355.
- Mendonça MG, Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis*. 2004.189:1018-1023.
- Menon M, Blair PA, Isenberg DA & Mauri C. A regulatory feedback between plasmacytoid dendritic cells and regulatory B cells is aberrant in systemic lupus erythematosus. *Immunity*. 2016. 44(3), 683-697.
- Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*. 2005. 201:747-754.



- Morgado FN, Schubach A, Vasconcellos E, Azeredo-Coutinho RB, Valete-Rosalino CM, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, Palmeiro MR, Conceição-Silva F. Signs of an in situ inflammatory reaction in scars of human American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2010. 32:285-295.
- Moriearty PL, Grimaldi G Jr, Galvão-Castro B, de Oliveira Neto MP, Marzochi MC. Intralesional plasma cells and serological responses in human cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1982. Jan;47(1):59-64.
- Nonata R, Sampaio R, Marsden PD. Mucosal leishmaniasis unresponsive to glucantime therapy successfully treated with AmBisome. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1997. 91:77.
- Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol.* 2009. 183(12):8088-98.
- Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, Cardoso TM, Ramasawmy R, et al. IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* infection. *Parasite Immunol.* 2011. 33:132–136.
- O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.* 2004. 10: 801-805.
- Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine.* 2014. 66(2):127-32.
- Ozbilge H, Aksoy N, Gurel MS, Yazar S. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. *J Med Microbiol.* 2006. 55:1329-31.
- Pape KA et al. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity.* 2007. 26(4):491–502.
- Pasparakis, Manolis, Ingo Haase, and Frank O. Nestle. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology.* 2014. 14.5:289-301.
- Pereira-Carvalho R, Mendes-Aguiar CO, Oliveira-Neto MP, Covas CJ, Bertho AL, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A. *Leishmania braziliensis*-reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved. *PLoS One.* 2013. 8:e81529, 1-8.
- Pessoa, SB. & Barreto, M.P. Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Educação e Saúde, Serviço de Documentação. São Paulo, Brazil. 1944.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 2008. 321(5891):970-4.
- Picker LJ. Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol.* 1994. 6:394-406.

- Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Torigian VK, Modlin RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol*. 1990. 145:3100-3104.
- Pissinate JF, Gomes IT, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA, Lemos EM. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 2008. 336:193-202.
- Pleass RJ, Woof JM. Fc receptors and immunity to parasites. *Trends Parasitol*. 2001. 17:545-551.
- Raqib R, Kamal SM, Rahman MJ, Rahim Z, Banu S, Bardhan, PK & Andersson J. Use of antibodies in lymphocyte secretions for detection of subclinical tuberculosis infection in asymptomatic contacts. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004. 11(6), 1022-1027.
- Rey L. *Leishmania* e leishmaníases: os parasitos. In: Rey L., *Parasitologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. p. 214-26.
- Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000. 192: 295-302.
- Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 1998. 31(1):143-8.
- Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol*. 2009. 25:505-510.
- Rodriguez-Pinto D, Saravia NG, McMahon-Pratt D. CD4 T cell activation by B cells in human *Leishmania (Viannia)* infection. *BMC Infectious Disease*. 2014. 14:108.
- Ronet C, Voigt H, Himmelrich H, Doucey MA, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, Tacchini-Cottier F, Bron C, Louis J, Launois P. *Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c mice. *J Immunol*. 2008. 180(7):4825-35.
- Ronet C, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, Mastelic B, Tacchini-Cottier F, Louis J & Launois P. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *The journal of immunology*. 2010. 184(2), 886-894.
- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002. 2(11):845-58.
- Sacks DL, Scott PA, Asofsky R, Sher FA. Cutaneous leishmaniasis in anti-IgM-treated mice: enhanced resistance due to functional depletion of a B cell-dependent T cell involved in the suppressor pathway. *J Immunol*. 1984. 132(4):2072-7.
- Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcaïs A, Argiro L, Dessein A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous

- lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. J Immunol. 2008. 180:6139-6148.
- Santos Cda S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, Costa J, Borges VM, de Oliveira CI, Van Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN $\gamma$ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. J Invest Dermatol. 2013. 133: 1533-1540.
- Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, Pacheco RS, Momen H, Conceicao-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KB. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. Am J Trop Med Hyg. 1998. 58:824-827.
- Scott P, Natovitz P, Sher A. B lymphocytes are required for the generation of T cells that mediate healing of cutaneous leishmaniasis. J Immunol. 1986. Aug 1;137(3):1017-21.
- Scott P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. J Immunol. 1991. 147: 3149-3155.
- Sebina I, Biraro IA, Dockrell HM, Elliott AM & Cose S. Circulating B-lymphocytes as potential biomarkers of tuberculosis infection activity. PloS one. 2014. 9(9), e106796.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004. 99:239-51.
- Soong L, Henard CA & Melby PC. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. In Seminars in immunopathology. 2012. Vol. 34, No. 6, pp. 735-751. Springer-Verlag.
- Souza WJ, Sabroza PC, Santos CS, de Sousa E, Henrique MF, Coutinho SG. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. Acta Trop 1992. 52:111-119.
- Su H, Feilzer K, Caldwell HD, Morrison RP. Chlamydia trachomatis genital tract infection of antibody-deficient gene knockout mice. Infect Immun. 1997. 65: 1993-1999.
- Toledo VP, Mayrink W, Gollob KJ, Oliveira MA, Costa CA, Genaro O, Pinto JA, Afonso LC. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001. 96:89-98.
- Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MI, Neto VA, Amato VS. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. Clin Immunol. 2008. 128:442-446.

- Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol*. 2003. 33:2822-2831.
- Vieira MG, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa AA Jr, Barral-Netto M, Barral A. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002. 97(7):979-83.
- Von Stebut, Esther, et al. Interleukin 1 $\alpha$  promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *The Journal of experimental medicine*. 2003. 198.2:191-199.
- WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. Disponível em: <[www.who.int/leishmaniasis/burden/Country\\_profiles/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Country_profiles/en/)>. Acesso em fevereiro de 2017.
- WHO. Leishmaniasis: country profiles. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em fevereiro de 2017.
- Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, Waisman A, Nigg AP, Knop J, Udey MC, von Stebut E. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc $\gamma$  receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med*. 2006. 203: 177-188.
- Wu W, Huang L, Mendez S. A live *Leishmania major* vaccine containing CpG motifs induces the generation of Th17 cells in C57BL/6 mice. *Eur J Immunol*. 2010. 40(9):2517-27.
- Yang X, Brunham RC. Gene knockout B cell-deficient mice demonstrate that B cells play an important role in the initiation of T cell responses to *Chlamydia trachomatis* (mouse pneumonitis) lung infection. *J Immunol*. 1998. 161(3):1439–1446
- Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, Ishibashi T, Yoshimura A, Yoshida H. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol*. 2006. 177: 5377-5385.
- Zajtchuk JT, Casler JD, Netto EM, Grogl M, Neafie RC, Hessel CR, Magalhaes AV, Marsden PD. Mucosal leishmaniasis in Brazil. *Laryngoscope*. 1989. 99:925-939.
- Zhang M, Zheng X, Zhang J, Zhu Y, Zhu X, Liu H, Zeng M, Graner MW, Zhou B, Chen X. CD19(+)/CD1d(+)/CD5(+) B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses. *Cell Immunol*. 2012. 274(1-2):89-97.