



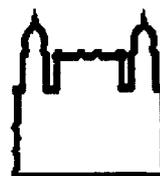
UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PAPEL DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS
NA IMUNOMODULAÇÃO DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR HUMANA**

CECILIA BEATRIZ FIUZA FAVALI

Salvador – Bahia

Junho 2003

77.2



004108

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**PAPEL DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS NA
IMUNOMODULAÇÃO DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR HUMANA**

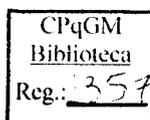
CECILIA BEATRIZ FIUZA FAVALI

Orientadora: Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de Mestre em
Patologia, área de concentração em
Patologia Experimental.

Salvador – Bahia

2003



Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz /
FIOCRUZ - Salvador - Bahia

F272p Favali, Cecilia Beatriz Fiuza
Papel das moléculas coestimulatórias na imunomodulação da leishmaniose tegumentar humana / Cecilia Beatriz Fiuza Favali. _ Salvador: Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia / Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2003.
101 f: il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana)- Universidade Federal da Bahia , Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2003.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Citocinas. 3. Imunomodulação. I. Título.

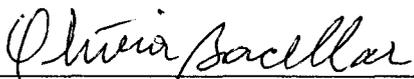
CDU 616.993.161:577.2

PAPEL DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS NA IMUNOMODULAÇÃO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA

CECÍLIA BEATRIZ FIUZA FAVALI

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar
Pesquisadora – Serv. Imunologia
HUPES / UFBA



Dra. Fabíola Cardillo
Pesquisadora Adjunta
CPqGM - FIOCRUZ



Dra. Claudia Ida Brodskyn
Pesquisadora Associada
CPqGM - FIOCRUZ

Aos meus pais

José Celso Favali e Ignês Meneleu Fiuza

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a colaboração de várias pessoas, tendo cada uma delas participação essencial para seu desfecho. Gostaria de demonstrar minha gratidão por cada gesto de apoio e atenção durante estes anos de trabalho, dentro e fora do laboratório.

Cláudia Brodskyn

Manoel Barral-Netto

Aldina Barral

Jackson Costa e pessoal do PIEJ

Pacientes de Jequié e Jiquiriçá

João Paulo de Oliveira

Dirceu Costa, Lilian Afonso e Viviane Conceição

Jorge Clarêncio e Omar Medina

Sílvia Cardoso e José Carlos Cardoso

Clarissa Teixeira e Régis Gomes

Jânia Teixeira

Rosália Meire e Yumara Evangelista

Colegas e professores do curso de pós-graduação em Patologia-UFBA-FIOCRUZ

Ana Maria Fiscina e pessoal da Biblioteca do CPqGM

Amigos LIP e LIM1

Todos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

CAPES

Minha família

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE ANEXOS.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	16
1.2 O PARASITO.....	17
1.3 FORMAS CLÍNICAS E AGENTES ETIOLÓGICOS.....	18
1.3.1 Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL).....	19
1.3.2 Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM).....	20
1.3.3 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD).....	20
1.4 <i>LEISHMANIA</i> E IMUNIDADE.....	21
1.5 MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS.....	26
1.5.1 A via CD28-B7.....	26
1.5.2 Antígeno 4 de Linfócito T Citotóxico (CTLA4).....	27
1.5.3 CD40 –CD40L.....	29
2 JUSTIFICATIVA.....	30
3 HIPÓTESE.....	30
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 GERAL.....	31
4.2 ESPECÍFICOS.....	31
5 ABORDAGEM EXPERIMENTAL.....	32
5.1 LOCAL DOS ESTUDOS DE CAMPO.....	33
5.2 PERÍODO DE COLETA DOS DADOS POPULACIONAIS.....	33
5.3 PACIENTES.....	33
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	34
5.5 CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO.....	34

5.6 CULTURA DE CÉLULAS PARA PRODUÇÃO DE CITOCINAS	35
5.7 CONCENTRAÇÃO DOS ANTICORPOS.....	35
5.8 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	36
5.9 EXPERIMENTO CONTROLE COM TOXÓIDE TETÂNICO.....	36
5.10 ANÁLISE FENOTÍPICA.....	37
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
6 RESULTADOS.....	38
6.1 CARACTERÍSTICAS DO GRUPO DE ESTUDO	38
6.2 PRODUÇÃO DE CITOCINAS	40
6.2.1 Bloqueio da interação CD40-CD40L	40
6.2.2 Bloqueio da interação CD28-B7	50
6.2.3 Correlação entre redução da produção de IFN- γ e de TNF- α pelo bloqueio de CD28-B7.....	60
6.2.4 Produção de IL-12.....	61
6.2.6 Teste com toxóide tetânico.....	63
6.3 Análise fenotípica por citometria de fluxo	66
7 DISCUSSÃO.....	69
8 CONCLUSÕES.....	78
9 REFERÊNCIAS.....	79
Anexo 1- Termo de Compromisso.....	96
Anexo 2 –Bloqueio da via CD40-CD40L	98
Anexo 3 –Bloqueio da via CD28-B7	99
Anexo 4 – Características clínicas dos pacientes - Jequié	100
Anexo 5- Características clínicas dos pacientes - Jiquiriçá.....	101

RESUMO

PAPEL DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS NA IMUNOMODULAÇÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA. CECILIA BEATRIZ FIUZA FAVALI.

A leishmaniose humana apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que variam desde a forma cutânea localizada até a forma com comprometimento visceral. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o papel de moléculas co-estimulatórias na leishmaniose humana. Assim, verificou-se o efeito destas moléculas na produção de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10) e caracterização fenotípica por citometria de fluxo de células de pacientes com a forma tegumentar da doença. Pacientes da área endêmica de Jequié - BA foram avaliados por exame clínico, Teste de Montenegro (DTH) e histopatologia. Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas e plaqueadas numa concentração de 5×10^6 /ml para coleta de sobrenadante e a dosagem de citocinas foi realizada pela técnica de ELISA. A análise fenotípica dos linfócitos T foi realizada por citometria de fluxo, coletando-se as células e marcando-as com anticorpos conjugados a fluorocromos (CD4, CD8, CD25 e CTLA4). As células de pacientes com leishmaniose tegumentar foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA 10 μ g/ml) com ou sem a adição de CTLA4 solúvel (para bloquear a interação CD28-B7) ou anti-CD40L (para bloquear a interação CD40-CD40L). Os resultados encontrados demonstram que o bloqueio da interação CD28-B7, via CTLA4 solúvel inibe a produção das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-12 e TNF- α . Este efeito é mais pronunciado nos pacientes que apresentam duração da lesão inferior a sessenta dias. Por outro lado, a interação CD40-CD40L parece não ser essencial na imunomodulação da leishmaniose tegumentar humana, já que não foram observadas alterações significativas na produção de citocinas quando se utilizou o anticorpo anti-CD40L. Não se verificou alteração significativa no padrão fenotípico de células CD4⁺ e CD8⁺ quanto aos marcadores de ativação recente (CD 25) nem quanto à expressão de CTLA4.

Palavras Chave: Leishmaniose Cutânea. Citocinas. Imunomodulação

ABSTRACT

ROLE OF COSTIMULATORY MOLECULES ON IMMUNOMODULATION OF HUMAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS CECILIA BEATRIZ FIUZA FAVALI.

Human leishmaniasis has a wide spectrum of clinical manifestations with tegumentary or visceral commitment. The objective of the present work is to evaluate the effect of co stimulatory molecules on cytokine production and T lymphocyte phenotype from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from cutaneous leishmaniasis patients. Tegumentary leishmaniasis patients from endemic area (Jequié-Bahia) were evaluated by clinic characteristics, histopathology and delayed type hypersensitivity (Montenegro test). PBMC were obtained from passage over a Ficoll- Hypaque gradient and plated (5×10^6 /ml) in complete medium. The cells were stimulated with soluble *Leishmania* antigen (SLA $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of soluble CTLA4 to block CD28-B7 interaction and anti human CD40L to block CD40-CD40L interaction. Supernatants were harvested at 24, 48 and 96 hours after culture for TNF- α , IL-10 and IFN- γ ELISA measurement, respectively. Cells were harvested (48 hours), stained with antibodies conjugated to fluorochromes (CD4, CD8, CD25 and CTLA4) and analyzed by flow cytometry. The results show the blockade of CD28-B7 downmodulate IFN- γ , IL-10, IL-12 and TNF- α secretion by PBMC from tegumentary leishmaniasis. This effect is evident in patients with less than sixty-day lesions. On the other hand, CD40-CD40L interaction seems not to be essencial on human tegumentary leishmaniasis imunomodulation. No alterations on cytokine production were observed when anti-CD40L blocked the interaction CD40-CD40L. T cells CD4⁺ and CD8⁺ phenotypic pattern was not altered concerning CTLA4 and CD25 expression when both costimulatory interactions were blocked.

Key-words: Tegumentary leishmaniasis, cytokines, imunomodulation

LISTA DE ABREVIATURAS

CMSP -	Células mononucleares do sangue periférico
SLA -	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
TNF- α -	Fator de necrose tumoral alfa
IL-1 -	Interleucina 1
IL-2 -	Interleucina 2
IL-4 -	Interleucina 4
IL-6 -	Interleucina 6
IL-10 -	Interleucina 10
IL-12 -	Interleucina 12
IFN- γ -	Interferon gama
TGF- β -	Fator transformador do crescimento beta
GM CSF-	Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos
PE -	Ficoeritrina
FITC -	Isotiocianato de fluoresceína
Cy -	Cychrome
LTA -	Leishmaniose tegumentar americana
LC -	Leishmaniose cutânea
LCM -	Leishmaniose cutâneo mucosa
LCD -	Leishmaniose cutâneo difusa
LD -	Leishmaniose disseminada
Th1 -	T helper 1
Th2 -	T helper 2
NO -	Óxido nítrico
DTH -	Hipersensibilidade tipo tardia
TCR -	Receptor da célula T
APC -	Célula apresentadora de antígenos
iNOS -	Óxido nítrico sintetase induzível
NK -	Célula <i>Natural Killer</i>
ELISA -	Ensaio imunoenzimático
TT -	Toxóide tetânico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Produção de TNF- α por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de anti-CD40L (10 μ g/ml)

Figura 2- Produção de TNF- α por CMSP de pacientes com menos de sessenta dias de lesão (**A, B**) com mais de sessenta dias de lesão (**C, D**), estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de anti-CD40L (10 μ g/ml)

Figura 3- Produção de IL-10 por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de anti-CD40L (10 μ g/ml)

Figura 4- Produção de IL-10 por CMSP de pacientes com menos de sessenta dias de lesão (**A, B**) com mais de sessenta dias de lesão (**C, D**), estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de anti-CD40L (10 μ g/ml)

Figura 5- Produção de IFN- γ por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de anti-CD40L (10 μ g/ml)

Figura 6- Produção de IFN- γ por CMSP de pacientes com menos de sessenta dias de lesão (**A, B**) com mais de sessenta dias de lesão (**C, D**), estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de anti-CD40L (10 μ g/ml)

Figura 7- Produção de TNF- α por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

Figura 8- Produção de TNF- α por CMSP de pacientes com menos de sessenta dias de lesão (A, B) com mais de sessenta dias de lesão (C, D), estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

Figura 9- Produção de IL-10 por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

Figura 10- Produção de IL-10 por CMSP de pacientes com menos de sessenta dias de lesão (A, B) com mais de sessenta dias de lesão (C, D), estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

Figura 11- Produção de IFN- γ por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

Figura 12- Produção de IFN- γ por CMSP de pacientes menos de sessenta dias de lesão (A, B) com mais de sessenta dias de lesão (C, D), estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

Figura 13- Correlação positiva entre a porcentagem de redução de IFN- γ e porcentagem de redução de TNF- α quando a interação CD28-B7 foi bloqueada via CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

Figura 14- Produção de IL-12 por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

Figura 15 - Produção de IFN- γ por CMSP de doadores reestimuladas *in vitro* com 5 LF/ml de toxóide tetânico

Figura 16- Produção de IL-10 por CMSP de doadores reestimuladas *in vitro* com 5 LF/ml de toxóide tetânico

Figura 17- Produção de TNF- α por CMSP de doadores reestimuladas *in vitro* com 5 LF/ml de toxóide tetânico

Figura 18 – “Dot plot” representativo gerado por citometria de fluxo.(A) População de células T (janela R1), mostrando dupla marcação para CD4⁺CD25⁺ e (B) População de células T (janela R2), mostrando dupla marcação para CD8+CD25

Figura 19 - Análise por citometria de fluxo da população celular gerada após reestimulação *in vitro* de CMSP de pacientes com SLA (10 μ g/ml), na presença de CTLA4lg (5 μ g/ml) e de anti-CD40L (10 μ g/ml)

LISTA DE TABELAS

Quadro 1- Características do grupo de estudo

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- Termo de compromisso

Anexo 2 - Produção de citocinas por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada. Bloqueio da via CD40-CD40L

Anexo 3 - Produção de citocinas por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada. Bloqueio da via CD28-B7

Anexo 4- Características clínicas dos pacientes - Jequié

Anexo 5- Características clínicas dos pacientes - Jequiçá

1. INTRODUÇÃO

1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

A leishmaniose é uma doença com ampla distribuição no Velho Mundo e Novo Mundo. É uma doença que compromete pele e mucosas (forma cutânea) e vísceras (forma visceral). O curso da infecção por *Leishmania* apresenta características clínicas variadas que dependem de fatores do parasito e da capacidade de resposta imune do hospedeiro (GRIMALDI, 1982).

A leishmaniose representa um importante problema de saúde pública e está incluída entre as seis mais importantes endemias do mundo. É endêmica em oitenta e oito países da América Latina, África, Índia, Europa e Ásia. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em todo o mundo cerca de 12 milhões de indivíduos estão infectados e que 1 em cada 19 habitantes do mundo estão sob o risco de se infectar (World Health Organization, Leishmaniasis Control) Disponível em: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/> . Acesso em 10/12/2002.

No Brasil, os relatórios epidemiológicos, apesar de incompletos, mostram que a incidência de leishmaniose vem aumentando. Em 1995, foram registrados 35583 casos, sendo que o maior índice foi verificado nas regiões Norte-Nordeste com 36.6% e 38% , respectivamente. No Estado da Bahia a Fundação Nacional de Saúde registrou um total de 2877 casos em 1989 e de 4105 casos em 1994.

Nos últimos vinte anos, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) vem apresentando franco crescimento, tanto em magnitude como em expansão geográfica, observando-se surtos epidêmicos nas regiões Sul, Sudeste, Centro Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Norte (Amazonas), relacionado ao processo predatório de colonização.

No Nordeste, houve um aumento gradativo no número de municípios atingidos pela LTA no período entre 1994 a 1998. Nos estados do Maranhão, Bahia, Ceará e Pernambuco, o coeficiente de detecção foi alto, sendo que no Estado da Bahia foram detectados 3.342 casos, o qual representa um coeficiente

de detecção de 25.72/100.000 hab. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>
Acesso em 10/12/2002

1.2 O PARASITO

O agente etiológico da leishmaniose é um protozoário da ordem Kinetoplastidae, da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*. As espécies de *Leishmania* são parasitos digenéticos ou dimórficos, que se multiplicam em formas amastigotas (intracelulares) no interior de macrófagos, e em formas promastigotas (extracelulares) no interior do trato digestivo dos vetores flebotomíneos, os quais realizam a transmissão do parasito para os hospedeiros vertebrados (LAINSON et al, 1987).

A transmissão do parasito ocorre quando o flebotomíneo fêmea infectado, ao picar o homem ou outros animais (domésticos e selvagens), injeta junto com a saliva as formas promastigotas (flageladas) infectantes, denominadas metacíclicas. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos residentes na derme via receptores e ligantes específicos. As leishmanias se instalam no compartimento fagolisossomial dos macrófagos (vacúolo parasitóforo) e se diferenciam em amastigotas, sobrevivendo e multiplicando-se por divisão binária. A habilidade para sobreviver no interior das células do hospedeiro reflete a adaptação evolutiva desses parasitos para evadir-se e resistir aos mecanismos efetores imunes do hospedeiro (HOWARD et al, 1980;MOSSER, 1994).

Inicialmente os critérios para identificação e classificação das espécies tinham como base as manifestações clínicas por elas produzidas aliadas às suas características epidemiológicas, geográficas e biológicas. Com o desenvolvimento de novos métodos bioquímicos e genéticos foi possível agrupar mais precisamente as diferentes espécies de *Leishmania* (GRIMALDI et al, 1989).

Antigos conceitos têm sido revistos, demonstrando que uma mesma espécie de parasito pode causar mais de um tipo de doença com considerável sobreposição de espécies de *Leishmania* (SILVEIRA et al, 1991).

1.3 FORMAS CLÍNICAS E AGENTES ETIOLÓGICOS

Existem duas formas clínicas básicas: tegumentar e visceral, sendo que a forma tegumentar apresenta um espectro amplo de manifestações clínicas e patológicas (BRYCESON, 1969).

Os parasitos que causam leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose cutânea mucosa (LCM) no Novo Mundo estão agrupados no complexo *L. braziliensis* e *L. mexicana*. Parasitos do complexo *L. braziliensis* geralmente causam LC e LCM, enquanto que aqueles que compõe o complexo *L. mexicana* geralmente não estão envolvidos com manifestações mucosas, causando apenas lesões cutâneas restritas e autolimitadas. *L. amazonensis*, a qual previamente considerava-se causar apenas lesões cutâneas localizadas (SILVEIRA et al, 1991), é agora associada com alguns casos de LCM e leishmaniose visceral (LV) (BARRAL et al, 1991).

O pólo responsivo é representado pela leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose cutânea mucosa (LCM). Neste caso, os pacientes apresentam uma forte reação de hipersensibilidade do tipo tardia ao antígeno de *Leishmania* (intensa imunidade mediada por células) e produção de níveis elevados de interferon γ (IFN- γ), em resposta aos antígenos parasitários quando testados *in vitro*. Por outro lado a imunidade humoral específica é menos exacerbada, com baixa produção de anticorpos (CARVALHO et al, 1985; CASTES et al, 1983).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), representa o pólo não responsivo ou anérgico. Os pacientes apresentam imunidade humoral exacerbada e ausência de resposta mediada por células (CONVIT et al, 1972). A resposta linfoproliferativa é deficiente e estes linfócitos não secretam IFN- γ quando estimulados com antígeno de *Leishmania*, mas produzem esta citocina quando desafiados com mitógenos ou antígenos não relacionados (MURRAY et al, 1984).

1.3.1 Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)

A leishmaniose cutânea localizada tem como principal característica uma lesão ulcerada, que se desenvolve, geralmente, nos membros inferiores, no local de inoculação do parasito pelo inseto vetor. A úlcera, de bordos elevados e fundo plano é geralmente auto limitada. A leishmaniose cutânea disseminada (LD) e a leishmaniose recidiva cutis são também formas localizadas de leishmaniose e causam ulcerações cutâneas múltiplas (CASTES et al, 1983; SARAVIA et al, 1989).

As lesões podem ter uma variedade de aspectos como pápulas, nódulos, úlceras, tubérculos ou placas infiltradas. A forma de LD pode ser observada em cerca de 1% dos casos e alguns pacientes apresentam mais de 700 lesões, certamente causado por disseminação hematogênica do parasito. Esta forma pode ser causada por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (COSTA et al, 1986; CARVALHO et al, 1994). Existe, também, a forma linfática da leishmaniose cutânea que é caracterizada por uma seqüência de nódulos ao longo da rota linfática, podendo ser causada por *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (WALTON et al, 1977).

Linfadenopatia regional com rápida resolução é comum na LC do Novo Mundo, especialmente na doença causada por *L. braziliensis*, e por vezes precede o aparecimento das lesões cutâneas (BARRAL et al, 1992; BARRAL et al, 1995b).

A leishmaniose recidiva cutis ou lupóide é caracterizada pela aparência de lesões ativas em volta das escaras ou por difusão periférica da lesão com cura central. No Brasil, a leishmaniose recidiva cutis tem sido causada tanto por *L. braziliensis* quanto *L. amazonensis* (BITTENCOURT et al, 1993).

No Novo Mundo, o agente que causa a forma clínica mais grave é a *L. braziliensis*. Cerca de 1% dos casos de LC por *L. amazonensis* podem disseminar apresentando múltiplas lesões, com aspecto de pápulas e úlceras pequenas (BARRAL et al, 1991).

1.3.2 Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM)

No Novo Mundo, aproximadamente 3% dos pacientes infectados com *L. braziliensis* são acometidos por LCM, menos freqüentemente está associada à infecção por *L. amazonensis* (BARRAL et al, 1991).

Provavelmente, o envolvimento da mucosa se desenvolve a partir da lesão primária por disseminação hematogênica do parasito para a mucosa nasal, palato, úvula, faringe e lábio superior. As lesões ocorrem num período que varia em algumas semanas a vários anos depois da infecção. Em uma área endêmica da Bahia (Brasil) 46% dos pacientes com LC desenvolveram lesões mucosas após dois anos da infecção cutânea (MARSDEN, 1986). O desenvolvimento da lesão mucosa aparece concomitantemente com lesões ativas de pele em 14%-28% dos pacientes ou surge depois de cura espontânea ou induzida por tratamento. Por outro lado, a doença mucosa ocorre sem uma lesão cutânea prévia em 16% dos casos. As lesões mucosas são infiltradas, com ulcerações que podem causar extensiva destruição do septo nasal. Perfuração septal é observada em 42% dos pacientes com LCM (MARSDEN, 1986).

1.3.3 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

A LCD é uma forma rara de leishmaniose reportada na América Central, América do Sul (especialmente no Brasil), República Dominicana e Venezuela. Os agentes são *L. aetiopica*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* (GUENOUN et al, 1990).

A lesão inicial assemelha-se à lesão observada na LCL, sem ulceração, sendo que a disseminação hematogênica ocorre após meses ou anos (BRYCESON, 1969).

O infiltrado difuso no rosto confere um aspecto similar à hanseníase Virchoviana. As lesões são geralmente não ulceradas, a menos que a área tenha sofrido algum trauma (BITTENCOURT et al, 1968). A LD é completamente diferente da LC difusa, na qual muitas lesões também são observadas, mas são nodulares e não ulceradas (CARVALHO et al, 1994).

As lesões podem evoluir, estendendo-se pelo corpo, com aspecto eritematoso ou com aparência de nódulos. As lesões não ulceram e a cicatrização espontânea de algumas lesões é acompanhada pelo aparecimento de outras. A disseminação ocorre pelos sistemas linfáticos, permanecendo na derme, não havendo visceralização (BARRAL-NETTO et al, 1995; MAUEL et al, 1981).

Na LCD não há resposta imune do tipo tardia ao antígeno do parasito *in vivo* (DTH ou reação de Montenegro negativa) nem *in vitro* (resposta linfoproliferativa) (CASTES et al, 1983; CASTES et al, 1984).

1.4 LEISHMANIA E IMUNIDADE

As citocinas parecem ter um papel importante na imunorregulação da infecção por *Leishmania*. Dois tipos de linfócitos T, T helper 1 (Th1) e Th2, apresentam diferentes perfis de secreção de citocinas. Na leishmaniose murina experimental já é bem estabelecido modelo de resistência e susceptibilidade em diferentes linhagens de camundongos. Um produção inicial de IL-4 no camundongo susceptível (BALB/c) está associada com uma resposta Th2, enquanto nas linhagens resistentes (C57/BL6, CBA e C3H) há desenvolvimento de resposta Th1 dependente de IL-12 na qual células T CD4⁺ produzem IFN- γ e levam à eliminação dos parasitas nos macrófagos (REINER et al, 1995). Também tem-se demonstrado que o TNF- α , citocina produzida por macrófagos, linfócitos T e outros tipos celulares, desempenha papel importante na proteção na leishmaniose murina experimental (THEODOS et al, 1991; TITUS et al, 1989).

Estudos de leishmaniose experimental indicam que estágios precoces da infecção são semelhantes tanto em animais susceptíveis quanto em resistentes, com uma marcada predominância de neutrófilos, muitos deles contendo parasitos. Macrófagos e eosinófilos estão presentes em menor número. Este aspecto é gradualmente substituído na linhagem susceptível por um aspecto monomórfico constituído predominantemente por macrófagos vacuolados cheios de amastigotas, enquanto em camundongos naturalmente resistentes é observado um infiltrado de linfócitos e plasmócitos e uma reação granulomatosa (ANDRADE

et al, 1984; BARRAL-NETTO et al, 1987). Este estágio é também caracterizado por sinais ultraestruturais de ativação de macrófagos nos animais imunizados (POMPEU et al, 1992). Precocemente na infecção experimental, os neutrófilos têm um papel parasiticida importante pela fagocitose, causando uma grande redução no número de parasitos (POMPEU et al, 1991).

Apesar da liberação destas substâncias, muitos parasitos permanecem intactos dentro dos macrófagos. Isto pode ser devido a presença de outras substâncias que contrabalançam a ação do IFN- γ , como IL-4 e IL-10 ou TGF- β , o qual tem sido demonstrado predominar em animais suscetíveis (BARRAL-NETTO et al, 1992). Observou-se que em modelos murinos, a adição de TGF- β em culturas de macrófagos aumentava a replicação de *L. braziliensis*, enquanto que o anticorpo neutralizante anti-TGF- β diminuía a infecção. O tratamento com TGF- β *in vivo* fez com que parasitos avirulentos se tornassem virulentos e causou reativação da infecção latente por *L. braziliensis* (BARRAL et al, 1993). Ainda quanto à modulação da leishmaniose murina, camundongos deficientes em IL-10, apresentavam maior resistência a *L. donovani* por aumento na produção de IFN- γ e IL-12. Verificou-se também que não era a ausência de IFN- γ e sim a presença de IL-10 que levava à forma ativa da doença (MURPHY et al, 2001).

É possível, então que o equilíbrio entre Th1 e Th2 bastante evidenciado nos modelos murinos de leishmaniose, também esteja implicado no variado espectro de formas clínicas da leishmaniose humana. Os macrófagos podem ser ativados por citocinas autócrinas (como o TNF- α) ou por citocinas produzidas pelas células T, incluindo o IFN- γ (MURRAY et al, 1983) e GM-CSF (WEISER et al, 1987), assim adquirindo capacidade antimicrobiana intracelular.

As promastigotas inoculadas na pele se transformam em amastigotas dentro dos macrófagos e se replicam dentro do vacúolo parasitóforo. São vários os fatores que influenciam sua sobrevivência. A resistência natural ocorre por mecanismos de defesa constitutivos, que são ativados em minutos ou segundos. Um exemplo é a fagocitose por macrófagos ou neutrófilos, a liberação de enzimas hidrolíticas ou intermediários reativos do oxigênio (oxidative burst). Outros

mecanismos requerem indução transcripcional ou síntese “de novo” de proteínas e não são funcionais no início da infecção. Exemplos são a produção de óxido nítrico (NO) pela NO sintase induzida ou tipo II (iNOS ou NOS2) entre outros (NATHAN, 1992).

Este processo é induzido por IFN- γ , uma citocina característica de células do tipo Th1 mas também liberada por células NK. Embora estas células sejam componentes da imunidade inata e potenciais indutores da NOS₂, a sua expressão e função foi raramente analisada e demonstrada na fase precoce da doença (JONES-CARSON et al, 1995; YU et al, 1998; DIEFENBACH et al, 1998, YOSHIMOTO et al, 1998).

Pacientes com lesões cutâneas crônicas expressam uma grande quantidade de citocinas pró inflamatórias como o TNF- α (MELBY et al, 1994). Quando CMSPs de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa são estimulados com *L. amazonensis*, ocorre um aumento de IFN- γ e TNF- α no sobrenadante da cultura. O IFN- γ é essencial para a ativação macrofágica necessária à destruição do parasito, por outro lado, IFN- γ também estaria envolvido na patogênese da doença por levar a um aumento do TNF- α (RIBEIRO-DE-JESUS et al, 1998).

No homem, altos níveis séricos de TNF- α não estão associados à proteção ou à prognóstico favorável (BIRKLAND et al, 1992; PISA et al, 1990). Embora tenha-se sugerido que altos níveis séricos de TNF- α possam participar de mecanismos patogênicos, estudos *in situ* sobre produção de TNF- α na leishmaniose tegumentar, não demonstram diferenças na expressão de RNAm para TNF- α na leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose cutânea mucosa (LCM) (DUJARDIN et al, 1993; PIRMEZ et al, 1993). Porém, verificou-se que os níveis séricos de TNF- α eram significativamente mais elevados nos pacientes com leishmaniose mucosa do que naqueles pacientes com a forma localizada. (DA-CRUZ et al, 1996) e também foi demonstrado que pacientes com a forma mucosa secretavam mais TNF- α e IFN- γ e menos IL-10 do que pacientes

com a forma localizada da doença quando CMSP eram estimuladas com SLA. (BACELLAR et al, 2002).

Quanto à modulação da resposta Th1, demonstrou-se que o TGF- β endógeno aumenta a susceptibilidade de macrófagos humanos à infecção com diferentes espécies de *Leishmania* e é detectado no sítio das lesões, na fase inicial da leishmaniose cutânea, e em casos de doença cutâneo-mucosa ativa. A adição de TGF- β exógeno nas culturas de macrófagos humanos aumentava o número de parasitos em torno de 50% (BARRAL et al, 1995c).

Outro ponto que diz respeito à regulação por citocinas, uma possível explicação para a patogênese da LCM ou casos de LCL com evolução desfavorável seria a presença de citocinas inibidoras de resposta tipo Th1 na fase inicial da infecção. Melby et al, (1996) demonstraram que IFN- γ e IL-12 estão aumentados nas lesões mais antigas da LCM, podendo, portanto ter um papel importante na patogênese desta doença.(MELBY et al, 1996). Confirmando estes dados, Rocha et al. (1999) observaram que pacientes com uma doença mais recente (menos de 60 dias de lesão) produziam menos IFN- γ e tinham um índice de estimulação menor ao antígeno de *Leishmania* do que aqueles pacientes com maior tempo de doença (mais de 60 dias). Por outro lado, a produção de IL-10 pelos CMSPs dos pacientes com lesão recente era maior do que em pacientes com lesão tardia. Este fato demonstra uma diminuição transitória na resposta Th1 dos pacientes com lesão recente, permitindo a sobrevivência e multiplicação do parasito com conseqüente desenvolvimento da doença. Comparando lesões de pacientes com LCM e LCL, Pirmez et al, (1993) encontraram maior quantidade de RNAm para IL-4 nas lesões de LCM, enquanto que IFN- γ e IL-12 tinham distribuições semelhantes. (PIRMEZ et al, 1993).

Em contraste a estes dados, Ajdary et al, (2000) estudando diferenças entre CMSPs de pacientes com leishmaniose cutânea recente e aqueles que não curavam, verificou que não havia produção de IL-10 detectável no sobrenadante destas culturas estimuladas com antígeno bruto de *Leishmania*. (AJDARY et al, 2000).

Em todas as formas de leishmaniose humana, a recuperação e a resistência à doença são dependentes de respostas efetivas de células T, com pouca participação de anticorpos específicos.

O teste cutâneo em leishmaniose tem sido de grande valor clínico e epidemiológico. A maioria dos pacientes com LC ou LCM ativas tem resposta positiva ao teste de hipersensibilidade tardia (DTH) ao antígeno de *Leishmania*. (BADARO et al, 1986). Resposta positiva ao DTH está diretamente relacionada com resistência à infecção futura.

Na LCM ativa a resposta é muito intensa, no que diz respeito ao teste intradérmico e à linfoproliferação, e os linfócitos destes pacientes produzem IFN- γ , o qual inibe a replicação intracelular de *Leishmania*. (CARVALHO et al, 1985), (BACELLAR et al, 2002)

Pacientes com LCD tem uma completa anergia ao antígeno de *Leishmania*. DTH é negativo e seus linfócitos não respondem ao antígeno de *Leishmania*, não ocorrendo linfoproliferação nem produção de citocinas (CASTES et al, 1983). Durante a fase ativa da doença, IFN- γ é indetectável enquanto que há RNAm para IL-10, IL-4 e IL-2. Com o tratamento, o IFN- γ passa a ser produzido enquanto que a produção de IL-10 diminui (BOMFIM et al, 1996)

Diferenças entre LC e LCD podem ser devidas pelo menos em parte a variações na composição antigênica do parasito. Antígenos preparados de parasitos isolados de casos humanos de LC estimularam maiores produções de IL-2 e IFN- γ , por linfócitos de pacientes com LC e LCD do que antígenos obtidos de isolados de LCM (AKUFFO et al, 1987). Com base nestes estudos foi postulado que parasitos isolados de LCD contém antígenos específicos que inibem a produção de IL-2 e IFN- γ . Estudando respostas murinas, Scott et al, (1988) demonstraram a presença de frações supressivas e protetoras. É possível que diferentes frações predominem em parasitos obtidos de pacientes com LCD e em parasitos que causam LC. Por outro lado, a manutenção da imunossupressão em humanos, parece ser dependente de fatores do hospedeiro (AKUFFO et al, 1987). É possível que diferentes frações antigênicas estimulem preferencialmente células Th1 ou Th2.

1.5 MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS

O mecanismo da resposta imune requer dois sinais para uma ativação efetiva dos linfócitos T. O reconhecimento antigênico dos linfócitos T, pelo seu receptor de células T (TCR) na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC) provê o primeiro sinal. O segundo sinal é dado pela interação das moléculas co-estimulatórias presentes na superfície das APCs e linfócitos T. As células T que recebem apenas o primeiro sinal entram num estado de ausência de resposta à estimulação.

Este conceito de co-estimulação levou a vários estudos que se concentram na identificação de moléculas acessórias de superfície capazes de fornecer sinais coestimulatórios às células T. Várias moléculas têm sido identificadas, desde aquelas que simplesmente aumentam a adesão àquelas que enviam sinais bioquímicos essenciais para a total ativação da célula T.

Como a co-estimulação das células T por células apresentadoras de antígeno tem mostrado influenciar na ativação das células T, seu papel vem sendo explorado em diversas infecções, dentre elas, a leishmaniose.

1.5.1 A via CD28-B7

A importância da via CD28-B7 tomou-se bastante clara nos últimos dez anos. Em 1988, Gaspari e colaboradores demonstraram que clones Th1 ao encontrarem o complexo antígeno-MHC na ausência de co-estimulação tornavam-se funcionalmente inativos. Quando restimulados estes clones não proliferavam e também não produziam citocinas, principalmente IL-2. O estado anérgico era revertido pela adição de IL-2 exógena ou pela ligação do CD28 de superfície com anti CD28 mAbs ou seus ligantes, B71(CD80) e B72 (CD86). (GASPARI et al, 1988)

A molécula de CD28 é uma glicoproteína de superfície expressa predominantemente em células T e timócitos em desenvolvimento (JUNE et al, 1994; GROSS et al, 1992). Em condições normais, 50% das células T CD8⁺ e todas as células CD4⁺, assim como as células T murinas, expressam CD28. Uma

comparação entre as seqüências de aminoácidos das formas do CD28 em humanos, roedores, bovinos e aves demonstram uma significativa homologia (67% entre camundongos e humanos). Este alto nível de conservação confirma um papel evolucionário importante para o CD28 na função das células T. (PARSONS et al, 1996). Embora o CD28 seja expresso constitutivamente na maioria das células T, sua expressão é dinâmica. A expressão do CD28 aumenta transitoriamente após ativação da célula T e reduz após sua ligação com B7. Esta redução da expressão resulta numa diminuição na capacidade da célula em mobilizar estoques intracelulares de cálcio, um componente crítico para efetivar a sinalização intracelular da célula T (LINSLEY et al, 1994).

No que diz respeito ao papel da via CD28-B7 em modelos murinos de leishmaniose, camundongos deficientes em CD28 mantinham seus fenótipos de resistência e susceptibilidade no curso na infecção, porém, quando os camundongos susceptíveis infectados com *L. major* eram tratados com CTLA4 –Ig (bloqueio da interação CD28-B7) , desenvolviam respostas protetoras (CORRY et al, 1994), sugerindo que a co-estimulação por B7 é essencial para a susceptibilidade. Verificou-se também que a co-estimulação via B7 é muito importante nas respostas iniciais após infecção por *L. major* tanto na linhagem murina resistente quanto na susceptível. Neste caso, a molécula de B7-2 é a que mais contribui por ser expressa constitutivamente nos macrófagos (ELLOSO E SCOTT, 1999).

1.5.2 Antígeno 4 de Linfócito T Citotóxico (CTLA4)

O Antígeno 4 de Linfócito T Citotóxico (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen – 4 , CTLA4), um homólogo estrutural do CD28 (30% homólogo) foi descoberto numa biblioteca de DNA complementar de genes de células T induzidos por ativação (BRUNET et al, 1987). CTLA4 é expresso em células T CD4+ e CD8+ em níveis 10-100 vezes menores que CD28, porém liga-se a B7-1 e B7-2 com uma constante de dissociação 20 a 50 vezes maior em relação ao CD28 (LINSLEY et al, 1991; WALUNAS et al, 1994; LINDSTEN et al, 1993; HARPER et al, 1991;

LINSLEY et al, 1994). O gene para o CTLA4 é muito relacionado ao CD28 e têm a mesma organização exon/intron com um domínio Ig "like", uma região transmembrana e um domínio citoplasmático (LINDSTEN et al, 1993; HARPER et al, 1991; DARIAVACH et al, 1988).

Existem outras diferenças funcionais entre CD28 e CTLA4. Embora o CD28 seja constitutivamente expresso na maioria de células T humanas e murinas em repouso, CTLA4 é expresso apenas após ativação das células, com um pico de ativação após 48- 72 horas (LINSLEY et al, 1991; LINDSTEN et al, 1993). O CTLA4 é expresso na superfície de células T CD4 e CD8 ativadas, porém, a maioria da proteína permanece intracelular (SHIRATORI et al, 1997; ALEGRE et al, 1996). Esta localização intracelular do CTLA4 é uma consequência direta da presença de um motivo de localização ínterna que causa rápida endocitose (SHIRATORI et al, 1997). A ligação da molécula do CD28 é essencial para uma expressão máxima de CTLA4. Células T deficientes em CD28 não aumentam eficientemente a expressão de RNA mensageiro para CTLA4 após a ativação, a não ser que IL-2 exógena seja adicionada (ALEGRE et al, 1996). A estimulação direta de CD28 via anti- CD28 acelera o acúmulo de RNA mensageiro para o CTLA4 em linfócitos de sangue periférico humanos, enquanto o aumento de CTLA4 em resposta ao antígeno é bloqueado por antagonistas do CD28 (WALUNAS et al, 1996).

As evidências fisiológicas do papel regulador negativo do CTLA4 surgiram com a utilização de camundongos deficientes em CTLA4. Estes camundongos desenvolveram uma doença linfoproliferativa espontânea com infiltrado em diversos órgãos e morriam por volta da quarta semana (WATERHOUSE et al, 1995). O tratamento de camundongos CTLA4^{-/-} com CTLA4 Ig evitou a linfoproliferação e a lesão tecidual, além de inibir a proliferação celular *in vitro*. Desta forma, verificou-se que a sinalização via B7-CD28 era necessária para o desenvolvimento da doença linfoproliferativa (GREENFIELD et al, 1997). No modelo murino de leishmaniose visceral, o bloqueio de CTLA4 aumentava a resistência do hospedeiro à infecção por *L. donovani* (MURPHY et al, 1998) e tomava a imunidade celular mais eficiente por aumento de IFN- γ e restauração da

resposta linfoproliferativa no calazar murino crônico (GOMES et al, 1998). Na malária experimental, entretanto, verificou-se que o CTLA4 era mais expresso em células T durante a fase a fase sangüínea e que o bloqueio de CTLA4 *in vivo* levou ao desenvolvimento da forma cerebral da doença diminuindo o tempo de vida dos animais. Isto demonstra a importância desta molécula na prevenção da imunopatologia da fase sangüínea da malária (JACOBS et al, 2002).

1.5.3 CD40 –CD40L

CD40 faz parte da superfamília do TNF-R, não possuindo os domínios intracelulares que promovem as vias efetoras da morte celular, e então levam a um aumento da sobrevivência celular, progressão do ciclo celular e regulação do desenvolvimento Th1/ Th2 (FOY et al, 1996; ROMAGNANI, 1995).

As interações CD40-CD40L estão primariamente envolvidas nas respostas primária e secundária de anticorpos e células B de memória. A ligação do CD40 em linfócitos B aumenta a agregação homotípica, proliferação, secreção e mudança de classe de imunoglobulina. A ligação CD40-CD40L durante as interações das células T CD4 e monócitos promove produção de INOS , IL-1, IL-6 e GM-CSF pelos monócitos. A interação CD40- CD40L em macrófagos e células dendríticas induzem IL-12 e aumentam a eliminação de patógenos intracelulares (FOY et al, 1996). CD40 é uma proteína integral de membrana de 40 – 45kDa predominantemente expressa em células B imaturas e maduras, células dendríticas foliculares e derivadas da medula óssea, células endoteliais e macrófagos ativados (KEHRY, 1996).

O ligante do CD40 (CD40L ou glicoproteína gp 39) é expresso em células T CD4 e algumas células CD8 ativadas, monócitos, células NK, mastócitos e basófilos (FOY et al, 1996). CD40L é rapidamente induzido nas células T CD4 e em sub grupos de células CD8, de 4 a 6 horas após a ativação, com picos de expressão em 24 horas, e decai com o tempo.

Levando em consideração estas propriedades do CD40, estudos têm sido realizados demonstrando seu papel na infecção por patógenos intracelulares.

Dados da literatura demonstraram que camundongos resistentes ,infectados com *Leishmania* e deficientes em CD40 ou CD40L não produziam IFN- γ e IL-12 (CAMPBELL et al, 1996). Em camundongos susceptíveis infectados com *L. major*, o bloqueio da interação CD40-CD40L com anti-CD40L levou a uma proteção por aumento de IL-12 ou IFN- γ (FERLIN et al, 1998). Partindo destes modelos murinos, Brodskyn et al, (2001), mostraram que CD40 e CD86 tinham papel essencial no início da ativação de linfócitos T anti – *Leishmania in vitro* pois o bloqueio de CD40 e CD86 diminuía significativamente a produção de IFN- γ , IL-12 e IL-5 após estímulo por macrófagos autólogos infectados com *L. major*.

2 JUSTIFICATIVA

Dados anteriormente expostos demonstram que as moléculas coestimulatórias têm papel essencial no padrão de resistência ou susceptibilidade no modelo murino de leishmaniose e que vários destes achados correlaciona-se com resultados obtidos usando células mononucleares de sangue periférico humano infectadas experimentalmente com *Leishmania*. Desta forma, torna-se relevante o estudo do bloqueio / estímulo de duas destas vias (CD40-CD40L e CD28/CTLA4-B7), utilizando células mononucleares do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea localizada em diferentes fases da doença, avaliando o padrão de produção de citocinas e a caracterização fenotípica de linfócitos T após cultura, visando um melhor entendimento da patogênese da doença no que diz respeito a imunorregulação.

3 HIPÓTESE

A interação das moléculas CD28-B7 e CD40-CD40L está envolvida na resposta imune de pacientes com leishmaniose cutânea localizada interferindo na produção de citocinas.

4 OBJETIVOS

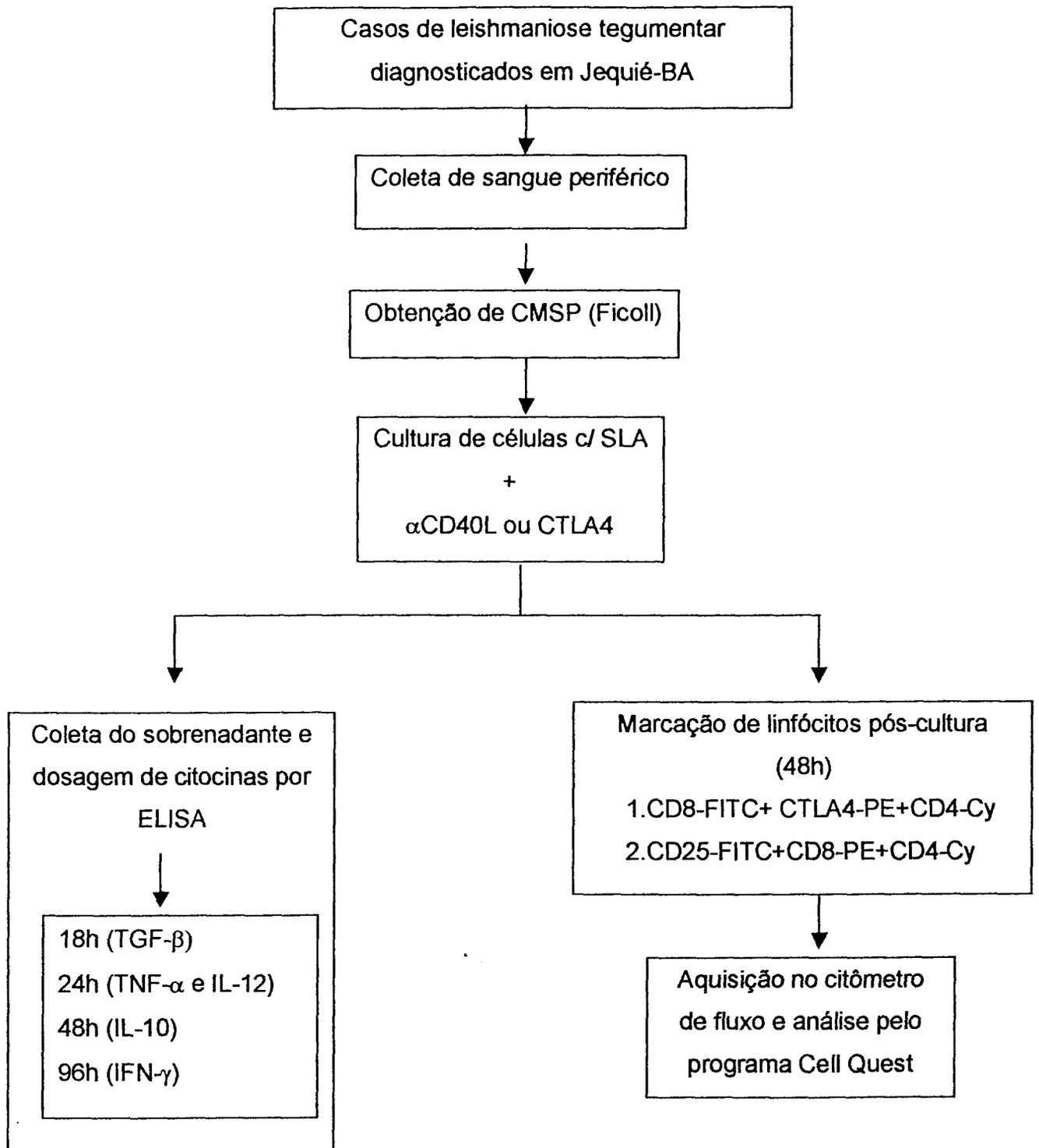
4.1 GERAL

Estudar o papel das moléculas co-estimulatórias na imunomodulação da leishmaniose humana utilizando células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes da área endêmica de Jequié –BA.

4.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito do bloqueio da interação CD28-B7, utilizando CTLA4 Ig, via produção de citocinas por células de pacientes com leishmaniose tegumentar estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA).
2. Avaliar o efeito do bloqueio da interação CD40-CD40L, utilizando anti-CD40L, via produção de citocinas por células de pacientes com leishmaniose tegumentar estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA).
3. Avaliar o perfil fenotípico das células dos pacientes com leishmaniose tegumentar estimuladas com SLA na presença ou ausência de CTLA4 Ig ou anti-CD40L.

5 ABORDAGEM EXPERIMENTAL



5.1 LOCAL DOS ESTUDOS DE CAMPO

Os estudos de campo foram realizados no município de Jequié, na Bahia, onde as leishmanioses são endêmicas. Jequié situa-se no sudoeste do estado (a 13°52' de latitude sul e 40°4' de longitude oeste), distando cerca de 100km do Oceano Atlântico e 380km de Salvador. O município apresenta uma área de 3.113 km², com clima semi-árido, temperatura média de 24°C e índice pluviométrico de 500mm³/ano. Embora a caatinga seja a vegetação predominante, existem áreas de floresta tropical úmida ou mata secundária. Jequié é um centro urbano com economias agropecuária e industrial e conta com um Centro de Referência em Doenças Endêmicas (PIEJ), o qual atende a população local e proveniente das adjacências (Contendas do Sincorá, Itagi e Jiquiriçá).

5.2 PERÍODO DE COLETA DOS DADOS POPULACIONAIS

O período de coleta de dados populacionais e realização dos experimentos foi entre Março de 2001 e Dezembro de 2002.

5.3 PACIENTES

A população de leishmaniose tegumentar estudada constituiu de casos ativos de leishmaniose tegumentar (LT) diagnosticados na área de Jequié e regiões adjacentes. Os pacientes foram examinados no PIEJ por médicos especializados e submetidos a testes no laboratório, visando o diagnóstico da doença.

Foram realizadas coletas de sangue periférico após assinatura do termo de consentimento pelos pacientes e biópsia das lesões para diagnóstico histopatológico.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram determinados como critérios de inclusão exame clínico detectando lesão compatível com diagnóstico de leishmaniose cutânea localizada, intradermorreação de Montenegro positiva, visualização de formas amastigotas na análise histopatológica da lesão e resposta ao tratamento com Glucantime[®] , 20mg Sb⁺⁵/ kg/ dia durante 20 dias. O tempo de cura foi considerado o intervalo em dias compreendido entre a observação da lesão e cicatrização total desta. Para fazer parte do grupo de estudo o paciente apresentou no mínimo dois dos critérios de inclusão anteriormente descritos.

5.5 CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll (Histopaque 1077 Sigma). O sangue diluído (1:2) foi adicionado lentamente de modo que a camada de Ficoll ficasse abaixo da camada de sangue. Centrifugou-se a 1500 rpm durante trinta minutos a temperatura ambiente. O plasma foi retirado e a camada de CMSP coletada. Esta foi lavada três vezes com solução salina estéril, a 4°C para retirada do Ficoll residual. As células foram ressuspensas em solução salina ou meio de cultura e realizou-se a contagem de células. Diluiu-se em solução de Turk para células frescas e em Trypan Blue para verificar a viabilidade. Realizou-se a contagem em câmara de Neubauer.

5.6 CULTURA DE CÉLULAS PARA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Após a contagem das células, ajustou-se a sua concentração para 5×10^6 /ml e ressuspendeu-se em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado com penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100µg/ml) e L-glutamina (2mM) (Gibco, Grand Island, NY), 10% de soro AB humano (Sigma), denominado meio completo, e as condições experimentais foram realizadas em triplicata. As células foram reestimuladas *in vitro* com 10 µg/ml de antígeno solúvel de *L. amazonensis* (MHOM/BR/86/BA125). Os sobrenadantes foram coletados 24, 48 e 96 horas após o início da cultura e conservados a -20°C até o momento do uso.

5.7 CONCENTRAÇÃO DOS ANTICORPOS

Nas culturas de CMSPs de pacientes com leishmaniose tegumentar, o CTLA4 Ig, que é uma proteína dimérica de fusão de 110kd, compreendida por um domínio extracelular do CTLA4 de 125 aminoácidos e a porção Fc murina da IgG2a, foi utilizado na concentração de 5 µg/ml (0.5 mg/ml CD152 Ig purificado - Ancell) para bloquear a interação CD28-B7. O anticorpo anti-CD40L humano (0.5 mg/ml anti CD154 humano purificado monoclonal, Pharmingen) constituído de uma IgG1, foi utilizado na concentração de 10 µg/ml para bloqueio da interação CD40-CD40L (BRODSKY et al, 2001). Anticorpos com isotipo igual aos daqueles utilizados nas condições experimentais, não relacionados, foram utilizados como controles nas mesmas concentrações. Para o controle de anti-CD40L utilizou-se uma IgG1 de camundongo (Pharmingen). No caso do CTLA4, utilizou-se uma IgG2a (Pharmingen), pois esta se constitui de parte da proteína de fusão CTLA4 Ig.

5.8 DOSAGEM DE CITOCINAS

As citocinas foram dosadas nos sobrenadantes por ensaio imuno enzimático (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (Pharmingen, San Diego, CA). A placa (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp surface, Nalgene Nunc Int, Roskilde, Dinamarca) foi sensibilizada com o anticorpo de captura anti citocina humana durante a noite a 4°C. O anticorpo de captura foi removido e a placa foi bloqueada com PBS/albumina bovina 0,01% e soro bovino fetal 10% por duas horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com PBS / Tween 0,05% e em seguida adicionou-se padrões e amostras que são incubados à temperatura ambiente por duas horas. A placa foi lavada novamente três vezes e adicionou-se o anticorpo anti citocina humana biotilado. Após incubar uma hora a temperatura ambiente e lavar a placa quatro vezes o conjugado foi adicionado e a placa foi incubada por trinta minutos a temperatura ambiente. Após lavar a placa cinco vezes, adicionou-se o substrato (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina + H₂O₂ + dimetilsulfóxido) e a placa foi incubada a temperatura ambiente para desenvolvimento de cor. A reação foi parada por adição de H₂SO₄ (8N). A densidade ótica foi lida no comprimento de onda 450nm e os valores foram convertidos em pg/ml baseando-se na curva padrão (Soft Max Pro 3.0 Molecular Devices Corporation Sunnyvale, CA).

5.9 EXPERIMENTO CONTROLE COM TOXÓIDE TETÂNICO

Células mononucleares do sangue periférico de doadores sadios imunizados foram reestimuladas *in vitro* com toxóide tetânico (5 LF/ml). A cultura foi realizada nas mesmas condições experimentais descritas para as células dos pacientes, na presença de CTLA4 Ig. O sobrenadante foi coletado para posterior dosagem de citocinas por ELISA, como descrito anteriormente.

5.10 ANÁLISE FENOTÍPICA

No segundo dia de cultura (48h) as células não aderentes (linfócitos) foram coletadas para caracterização fenotípica por citometria de fluxo. Analisaram-se as populações CD4⁺ e CD8⁺ quanto a dois marcadores de ativação, CD25 e CTLA4. Após lavagens consecutivas com salina, as células foram bloqueadas com PBS 1% albumina bovina, azida 0.1% e soro bovino fetal a 20%. Em seguida foi realizada a marcação tripla com anticorpos específicos marcados com fluorocromos:

1. Anti-CD8 – FITC (isotiocianato de fluoresceína), anti-CTLA4- PE (ficoeritrina) e anti CD4 – Cy (cychrome), (Pharmingen)
2. Anti-CD25- FITC (isotiocianato de fluoresceína), anti-CD8 PE (ficoeritrina) e anti CD4 Cy (cychrome) (Pharmingen)

Após uma hora de incubação, as amostras foram adquiridas utilizando o aparelho FACSort (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA). Após aquisição, os resultados foram analisados utilizando o programa Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA).

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o programa Graphpad-Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). Os valores obtidos na dosagem de citocinas e as frequências celulares obtidas por citometria de fluxo foram comparados utilizando o teste não paramétrico e pareado de Wilcoxon. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Nos resultados estarão representados os valores das medianas obtidas em cada condição experimental.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS DO GRUPO DE ESTUDO

Os pacientes que fizeram parte do grupo de estudo apresentaram, no mínimo dois dos critérios de inclusão estabelecidos.

O grupo de estudo está constituído de um total de 35 pacientes, apresentando uma idade média de 27 anos (27 ± 18) variando de um mínimo de 5 e um máximo de 61 anos, sendo que 19 tinham idade maior ou igual há 20 anos (54,3%) e 16 tinham idade menor que 20 anos (45,7%). O grupo é constituído de 21 pacientes do sexo masculino (60%) e 14 pacientes do sexo feminino (40%).

Quanto às características clínicas dos pacientes, observou-se que 31(88,5%) apresentaram teste cutâneo de Montenegro positivo, enquanto que apenas 1 paciente (2,8%) apresentou o teste negativo. O teste não foi realizado em 8 pacientes (22,8%). No que diz respeito a linfadenopatia regional, 18 (34,3%) relataram não ter ocorrido, enquanto que 21 (60%) relataram linfadenopatia. Do total de pacientes, 2 (5,7%) não souberam informar se houve linfadenopatia. Quanto a duração da lesão no momento do atendimento, a média foi de 55 dias ($55 \pm 38,6$) apresentando um mínimo de 15 e um máximo de 150 dias. Ainda referente à duração da lesão, 19 (54,3%) apresentaram duração da lesão menor que 60 dias enquanto que 16 (45,7%) apresentaram duração da lesão maior ou igual a 60 dias. O diâmetro médio da lesão apresentada pelo grupo foi de 3,3 cm ($3,3 \pm 2,2$), com um mínimo de 1mm e máximo de 10 mm. Do total de pacientes, nove (25,7%) não retornaram ao ambulatório após o tratamento. Dentre aqueles que retomaram, todos apresentaram cura com cicatrização da lesão, tendo um tempo de cura médio de 74 dias ($74 \pm 40,7$), com um mínimo de 20 e um máximo de 180 dias. A histopatologia das lesões foi realizada em 30 pacientes, em 13 (38,2%) foram visualizadas amastigotas na análise histopatológica, enquanto que em 16 (47%) não se visualizou amastigotas nas biópsias das lesões. Cinco pacientes (14,8%) não tiveram biópsia realizada.

TABELA I - Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea localizada

Característica	Valores
Idade (anos)	27± 18
Mínima - máxima	5-61
Sexo feminino	14(40%)
Sexo masculino	21 (60%)
Idade da lesão no momento do atendimento (dias)	55 ± 38,6
≥ 60 dias	19 (54,3%)
< 60 dias	16 (45,7%)
Tamanho da lesão (cm)	3,3 ± 2,2
Mínimo e máximo	1 -10
Linfadenopatia regional	
Sim	21 (60%)
Não	18 (34,3%)
Não soube informar	2 (5,7%)
Teste de Montenegro	
Positivo	31(88,5%)
Negativo	1 (2,8%)
Não realizado	8 (22,8%)
Diagnóstico histopatológico de leishmaniose cutânea	
Positivo	13 (38,2%)
Negativo	16 (47%)
Não realizado	5 (14,8%)
Tempo de cura (dias)	74 ± 40,7
Mínimo e máximo	20-180

6.2 PRODUÇÃO DE CITOCINAS

6.2.1 Bloqueio da interação CD40-CD40L

As CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar localizada foram estimuladas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de SLA e a interação CD40-CD40L foi bloqueada pelo uso de anti-CD40L (10 $\mu\text{g/ml}$). Verificou-se não haver alteração significativa na produção de TNF- α , IL-10 e IFN- γ nos sobrenadantes de CMSP de pacientes quando adicionou-se anti-CD40L (10 $\mu\text{g/ml}$) às culturas estimuladas com antígeno de *Leishmania*.

Quando avaliamos a produção de TNF- α por CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar, o valor obtido nos sobrenadantes das culturas foi de 239,3 pg/ml quando as células foram estimuladas apenas com SLA e 120,6 pg/ml quando utilizou-se concomitantemente SLA e anti-CD40L nas culturas, sendo esta diferença não estatisticamente significativa ($p= 0,3344$). **FIGURA 1 A e B**

Em alguns casos, a produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas estimuladas com SLA ficou abaixo do nível de detecção mínimo do teste (15 pg/ml). Por este motivo os dados foram representados e analisados excluindo-se estes que ficam baixo dos níveis de detecção do teste.

Os resultados com anticorpos isotipos controle também não apresentaram diferenças significativas na produção das citocinas estudadas.

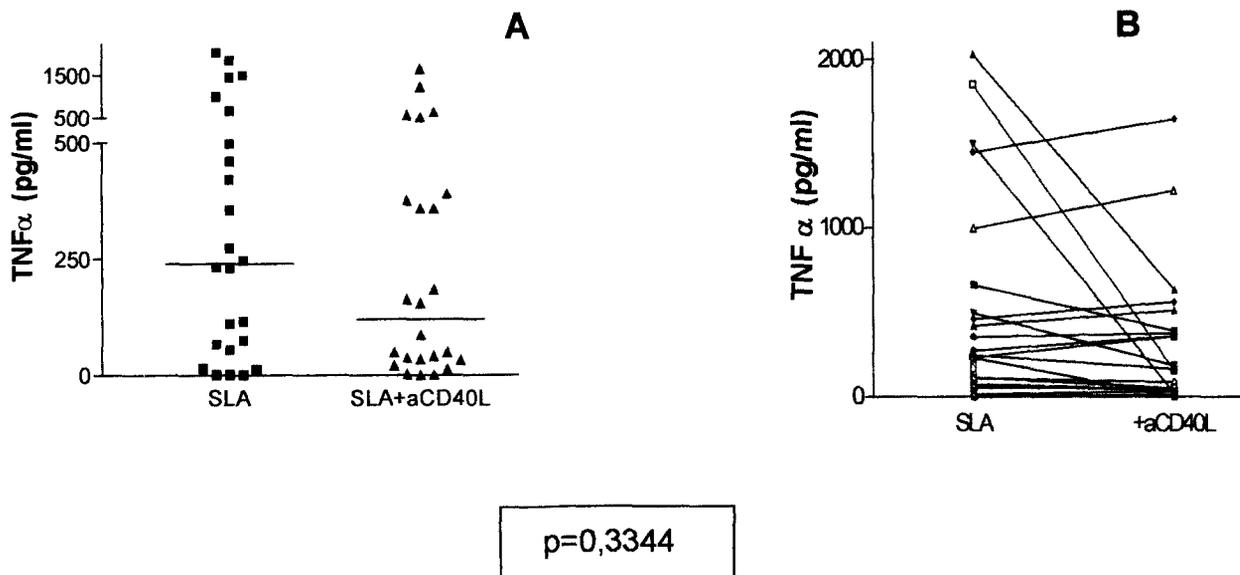
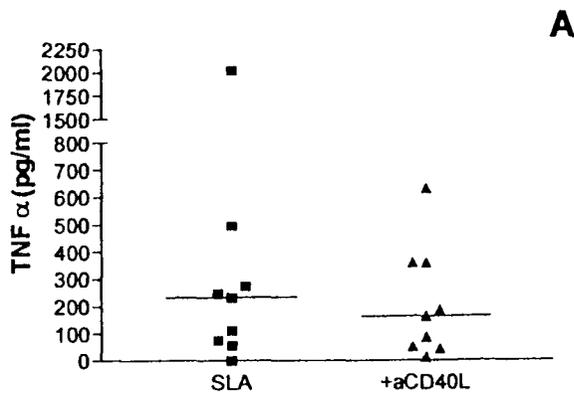


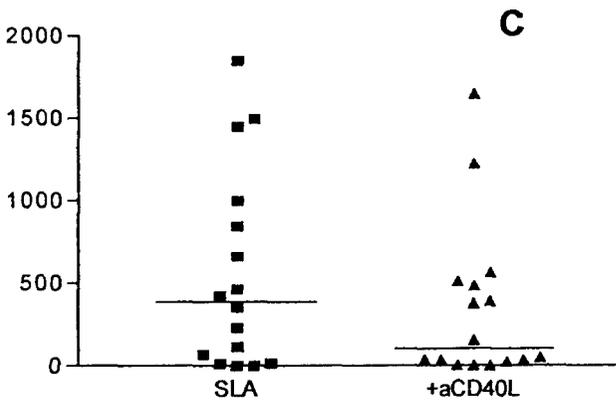
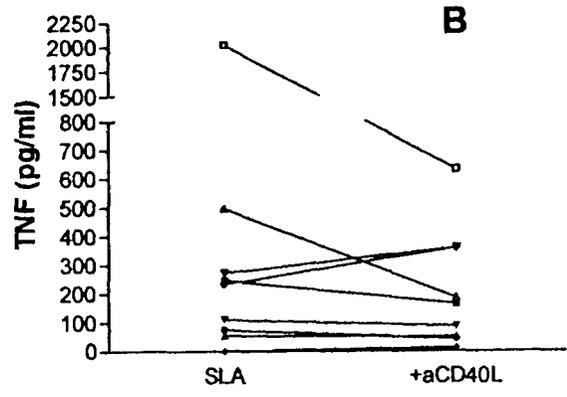
Figura 1 - Produção de TNF α por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de anti-CD40L (10 μ g/ml)

O bloqueio da via CD40-CD40L não surtiu efeito significativo mesmo quando se dividia o grupo entre pacientes com mais e menos de sessenta dias de lesão. No grupo com lesão mais recente (menos de sessenta dias) a produção de TNF- α frente ao estímulo com SLA foi de 232,5 pg/ml e na presença de anti-CD40L de 163,5 pg/ml (p= 0,4268). FIGURA 2 (A e B)

Por sua vez, o grupo de pacientes com lesão mais tardia (mais de sessenta dias de lesão) apresentou uma dosagem de TNF- α de 386,4 pg/ml quando estimuladas com SLA e de 102,3 pg/ml na presença de anti-CD40L (p= 0,3894). FIGURA 2 (C e D)



p=0,4258



p=0,3894

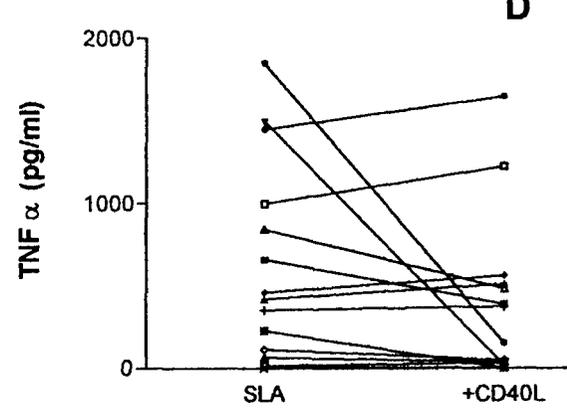
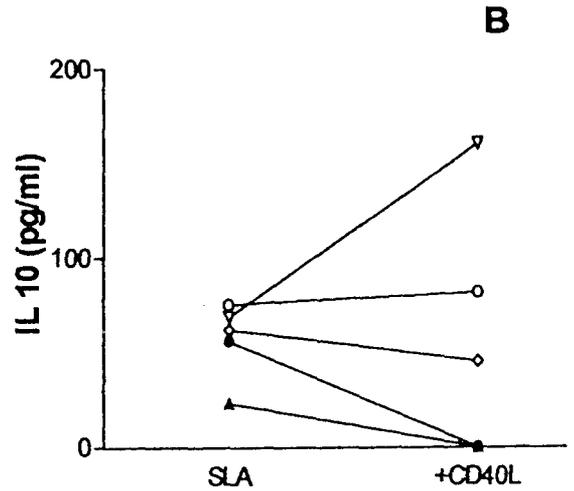
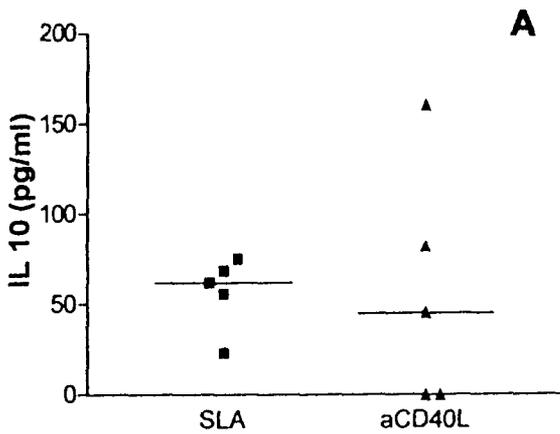


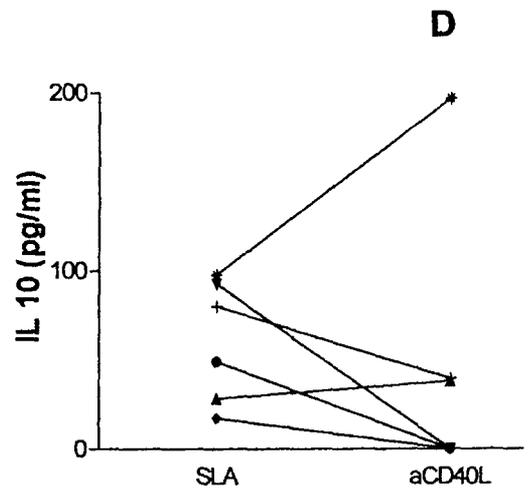
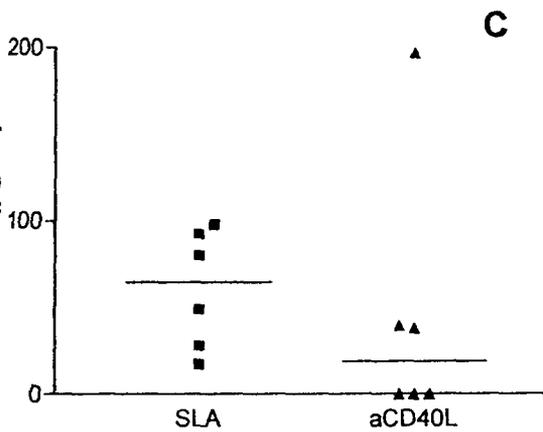
Figura 2 - Produção de TNF- α por CMSP de pacientes com menos de sessenta dias de lesão (A, B) com mais de sessenta dias de lesão (C, D) estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de anti-CD40L (10 μ g/ml)

Estudando a resposta quando à produção de IL-10 em pacientes com lesão recente e tardia, não se verifica uma diferença significativa pelo bloqueio da via CD40-CD40L. No grupo com menos de sessenta dias de lesão a produção foi de 62,08 pg/ml frente ao estímulo com SLA, enquanto na presença de anti-CD40L a produção foi de 45,19 pg/ml ($p=0,8125$). **FIGURA 4 (A, B)**

Já no grupo com mais de sessenta dias de lesão a produção de IL-10 foi de 64,61 pg/ml e na presença de anti-CD40L a produção foi de 19,03 pg/ml, sendo esta diferença não significativa. ($p= 0,2500$) **FIGURA 4 (C, D)**



$p=0,8125$



$p=0,2500$

Figura 4 - Produção de IL-10 por CMSP de pacientes com menos de sessenta dias de lesão (A, B) com mais de sessenta dias de lesão (C, D) estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de anti-CD40L (10 μ g/ml)

Dando continuidade ao estudo da produção de citocinas, verificou-se o efeito do bloqueio da via CD40-CD40L na produção de IFN- γ . Quando as células dos pacientes foram reestimuladas somente com SLA a produção foi de 1986 pg/ml e na presença de anti-CD40L 1825 pg/ml ($p= 0,0842$)

FIGURA 5 (A, B)

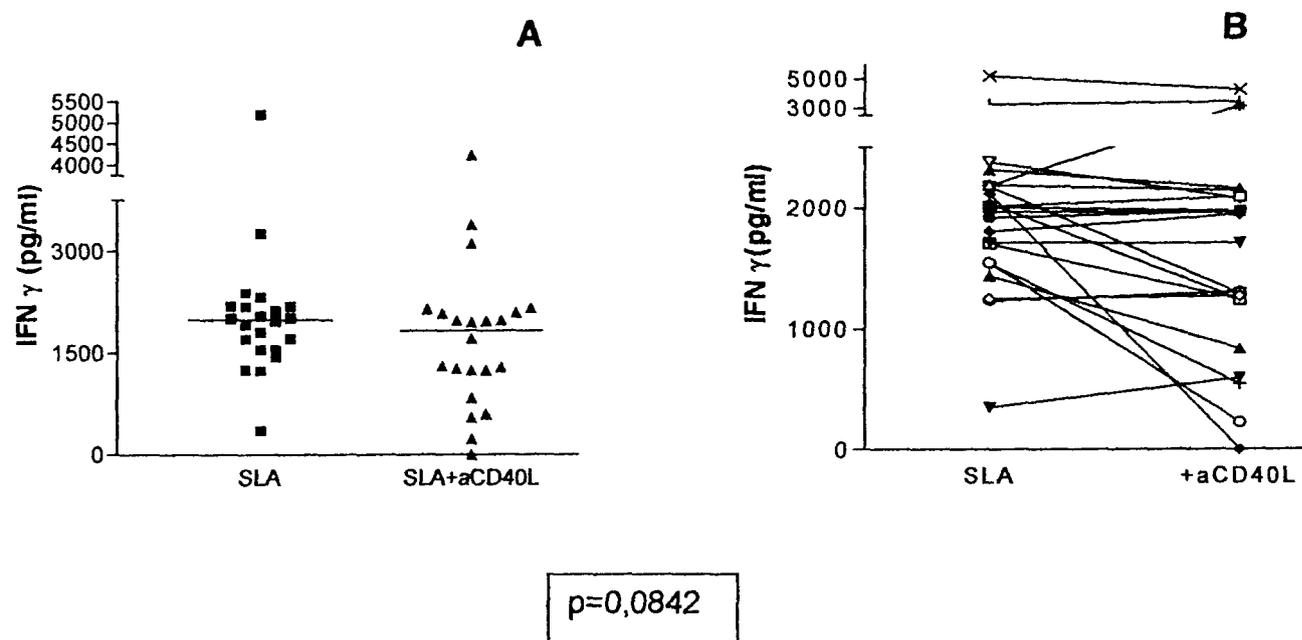


Figura 5 - Produção de IFN- γ por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de anti-CD40L (10 μ g/ml)

Ainda quanto à produção de IFN- γ , os grupos foram novamente separados e avaliados. O grupo de pacientes com lesão mais recente apresentou uma produção de 1546 pg/ml quando estimuladas com SLA e 1270 pg/ml na presença de anti-CD40L ($p=0,8203$). **FIGURA 6 (A, B)**

O grupo de pacientes com doença mais tardia apresentou uma produção de 2180 pg/ml quando estimuladas somente com SLA e de 2023 pg/ml na presença de anti-CD40L ($p= 0,1189$). **FIGURA 6 (C, D)**

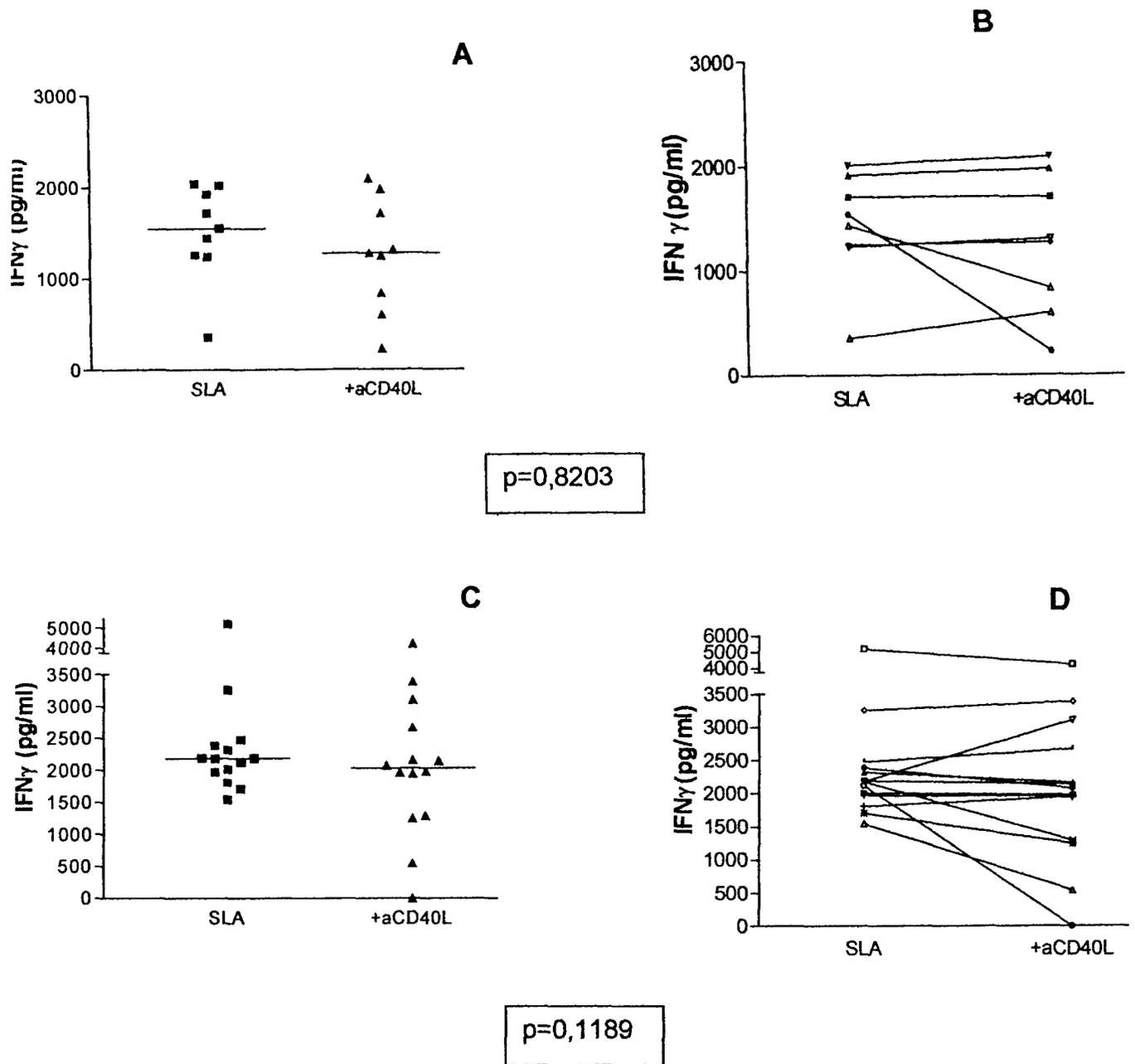


Figura 6 - Produção de IFN- γ por CMSP de pacientes com menos de sessenta dias de lesão (A, B) com mais de sessenta dias de lesão (C, D) estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de anti-CD40L (10 μ g/ml)

6.2.2 Bloqueio da interação CD28-B7

As CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar estimuladas com SLA também foram submetidas ao bloqueio de interação CD28-B7 via CTLA4 Ig. A produção de citocinas não foi alterada pelo uso do anticorpo isotipo controle utilizado na mesma concentração. Dentre o total de sobrenadantes avaliados, dois apresentaram quantidade de TNF- α inferior ao nível de detecção do teste (abaixo de 15 pg/ml) e foram excluídos da análise. Quanto ao TNF- α , verificou-se uma diminuição significativa na secreção desta citocina avaliada no sobrenadante das culturas de CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar de 271,8 pg/ml para 37 pg/ml quando CTLA4 Ig foi utilizado para bloquear a interação CD28-B7 ($p= 0,0003$).

FIGURA 7 (A, B)

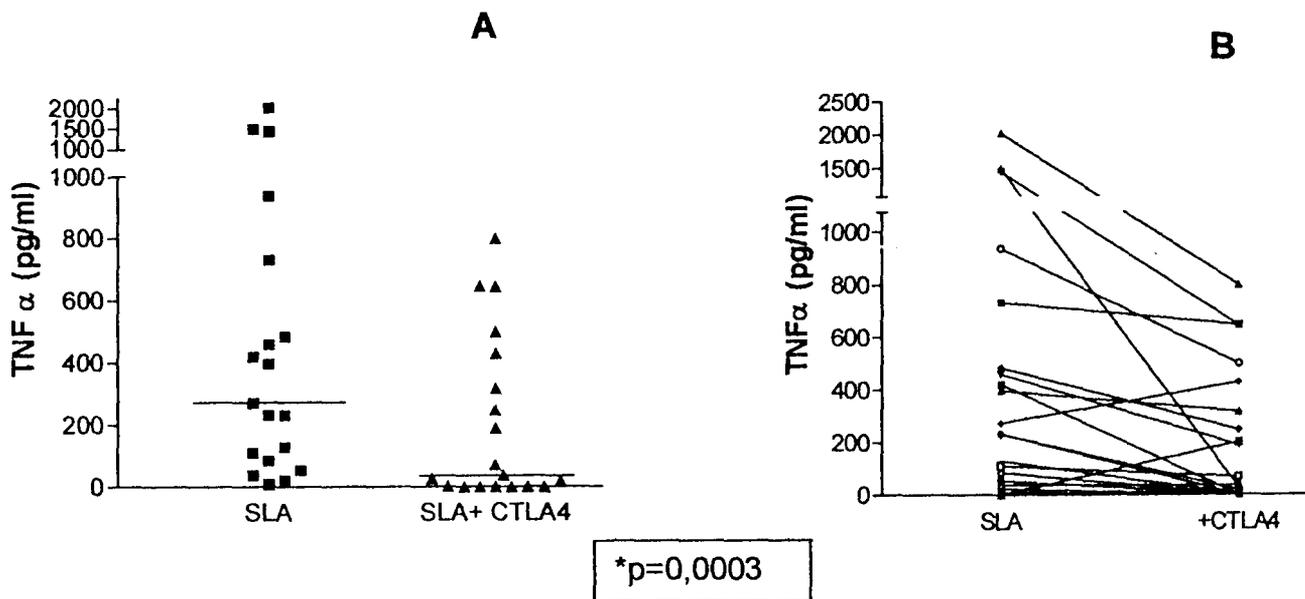
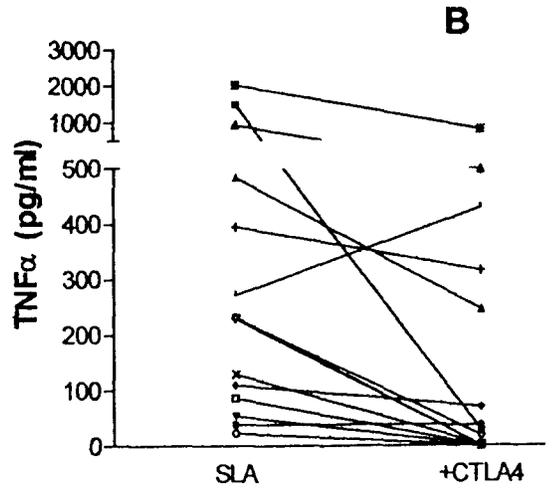
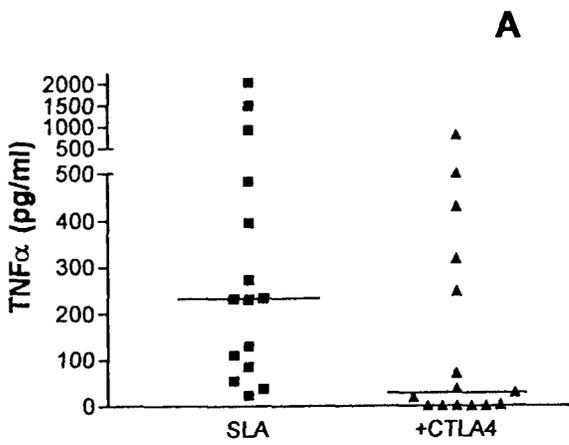


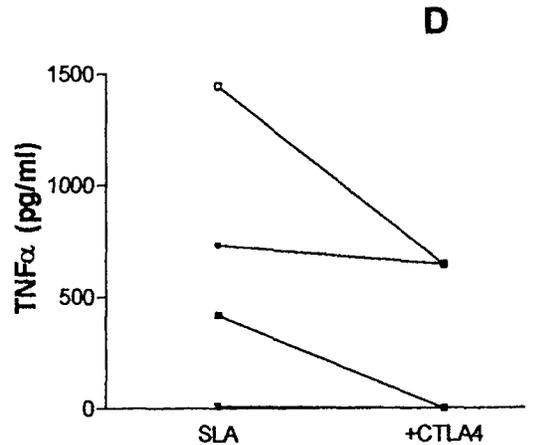
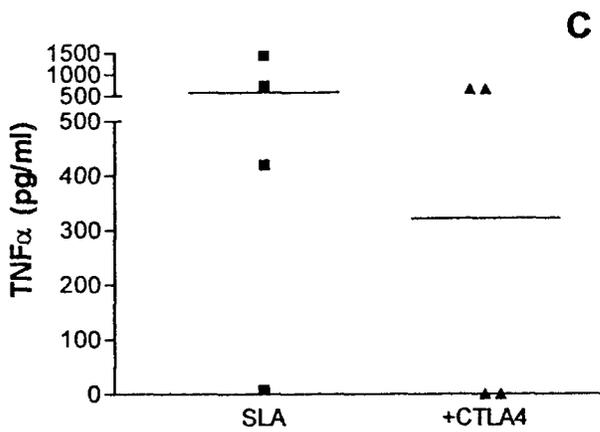
Figura 7 - Produção de TNF- α por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

Ao separarem-se os dois grupos de pacientes, percebe-se que a diminuição é significativa somente no grupo de pacientes com menos de sessenta dias de lesão. Neste grupo a produção de TNF- α diminuiu de 231,2 pg/ml para 27,9 pg/ml sendo estatisticamente significativa ($p=0,0015$). **FIGURA 8 (A, B)**

Por outro lado, o grupo de pacientes com lesão mais tardia apresentou uma produção de 575,5 pg/ml e na presença de CTLA4 Ig foi de 321,8 pg/ml, sendo esta diferença não significativa ($p=0,125$). **FIGURA 8 (C, D)**



*p=0,0015



p=0,125

Figura 8 - Produção de TNF- α por CMSP de pacientes com com menos de sessenta dias de lesão (A, B) com mais de sessenta dias de lesão (C, D), estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

Partindo-se para a avaliação dos grupos quanto ao tempo de lesão, verificase que a diminuição foi significativa apenas no grupo de pacientes com tempo de lesão inferior a sessenta dias onde a produção de IL-10 diminuiu de 68,66 pg/ml para 6,4 pg/ml ($p= 0,0313$). **FIGURA 10 (A, B)**

Por outro lado, o grupo com lesão tardia não apresentou diferenças significativas, sendo a produção de IL-10 44,2 pg/ml frente ao estímulo com SLA e de 34,85 pg/ml na presença de CTLA4 Ig ($p=0,2500$). **FIGURA 10 (C, D)**

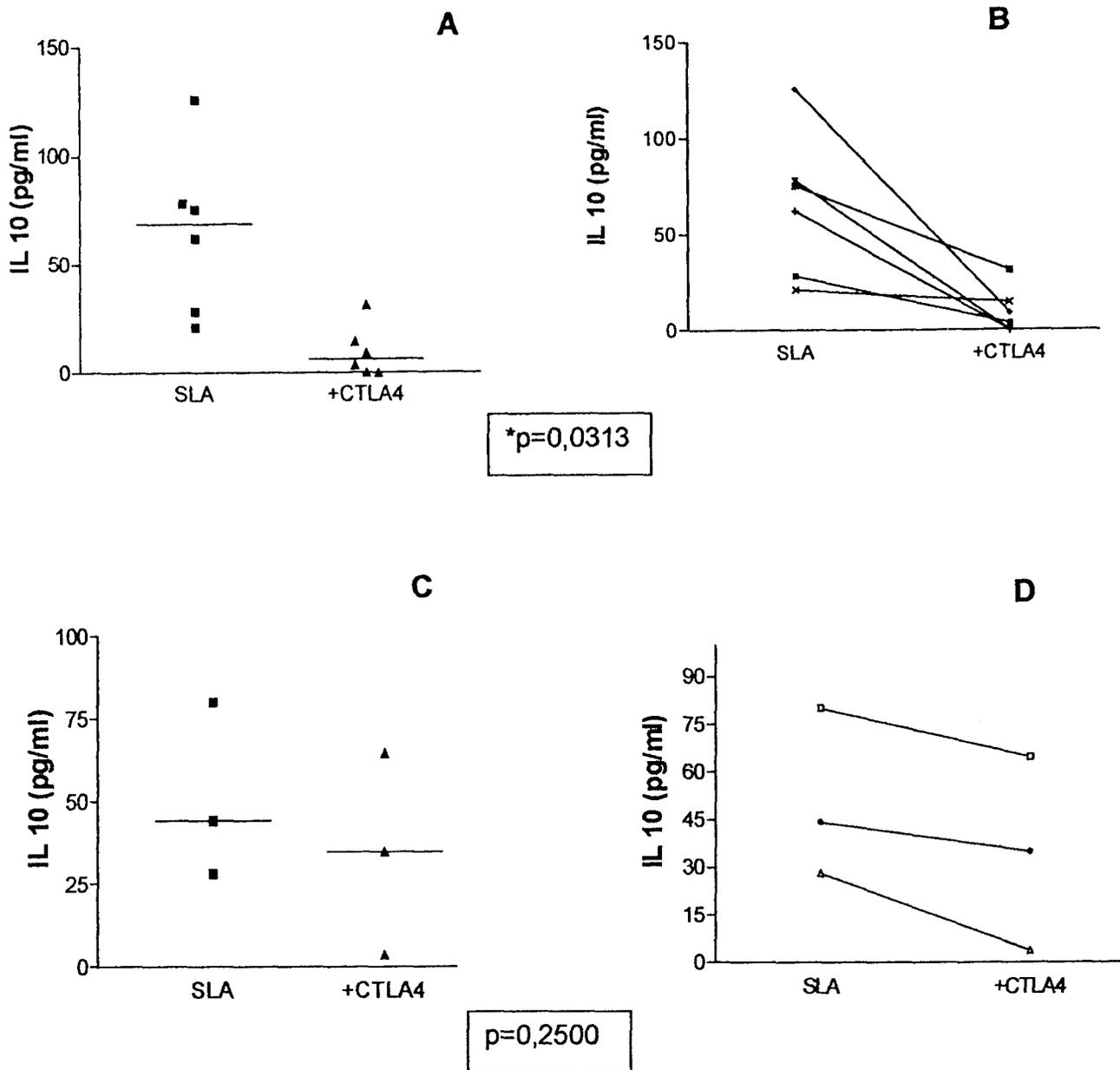


Figura 10 - Produção de IL-10 por CMSP de pacientes com com menos de sessenta dias de lesão (A, B) com mais de sessenta dias de lesão (C, D), estimuladas com SLA (10µg/ml) na presença de CTLA4 Ig (5µg/ml)

A produção de IFN- γ apresentou diminuição em seus níveis quando as CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar foram reestimuladas *in vitro*. A avaliação de todos os pacientes obteve uma produção de IFN- γ de 1966 pg/ml quando estimuladas com SLA e de 1262 pg/ml na presença de CTLA4 Ig ($p=0,0023$). FIGURA 11 (A, B)

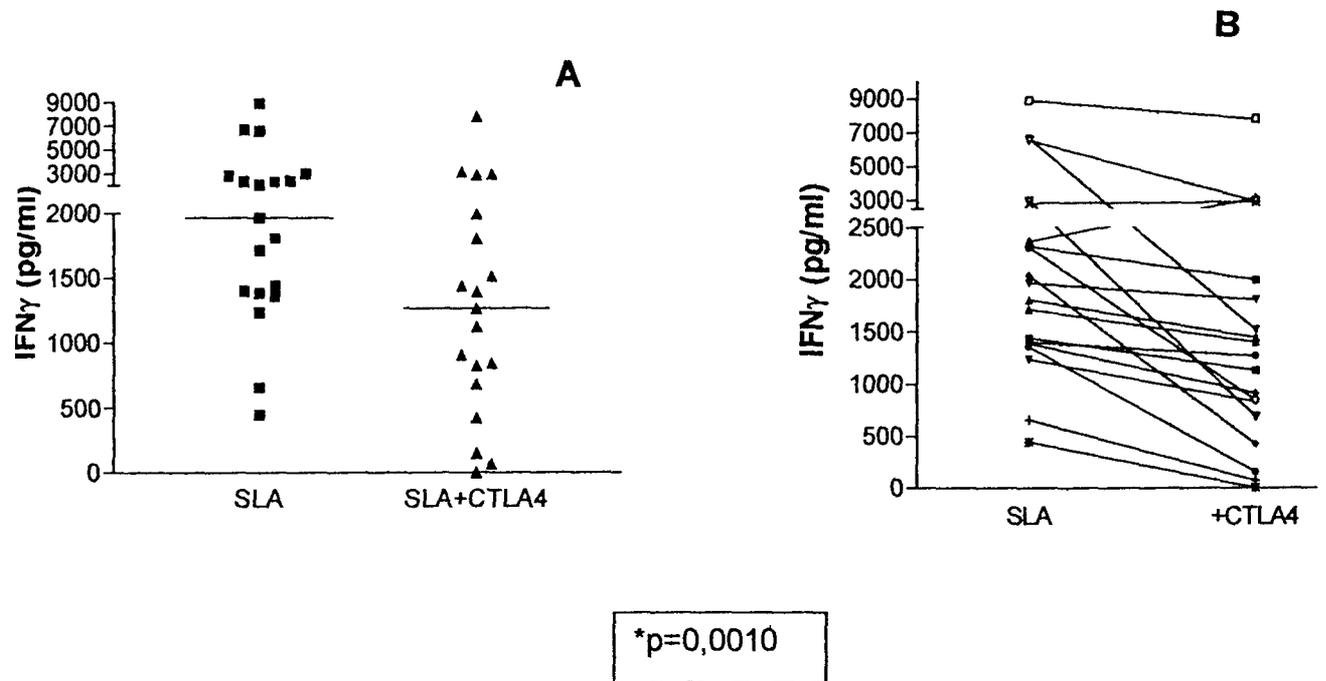


Figura 11 - Produção de IFN- γ por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

Este efeito também ocorreu no grupo de pacientes com menos de sessenta dias de lesão. Neste grupo observou-se uma diminuição de 1738 pg/ml quando CMSP foram estimuladas com SLA para 874,2 pg/ml com o uso de CTLA4 Ig.

FIGURA 12 (A, B)

No grupo de pacientes com mais de sessenta dias de lesão, a produção frente ao estímulo com SLA foi de 2061 pg/ml e na presença de CTLA4 foi de 1716 pg/ml ($p=0,0625$). Apesar da diminuição, esta não foi estatisticamente significativa.

FIGURA 12 (C, D)

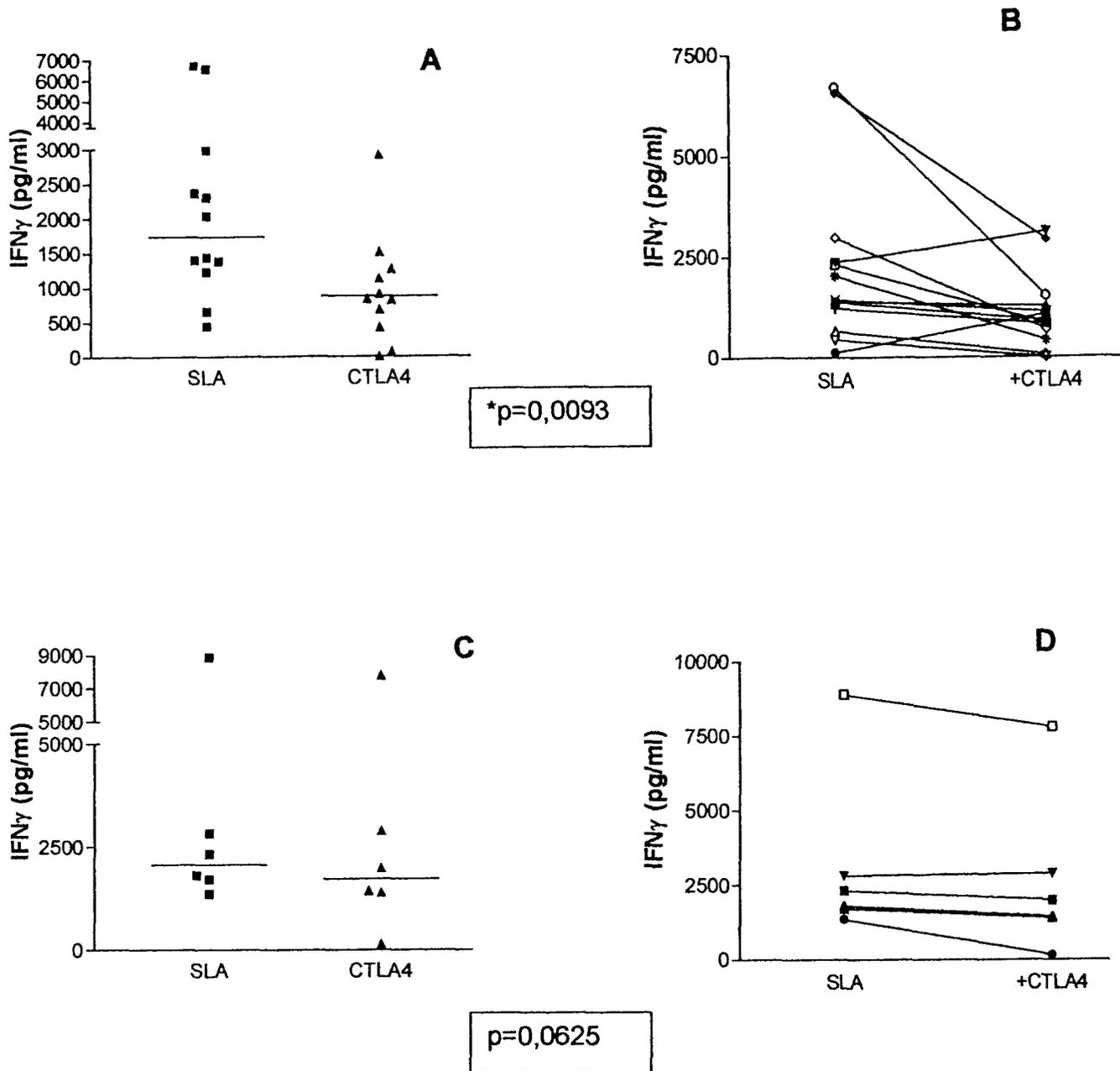


Figura 12 - Produção de IFN- γ por CMSP de pacientes com com menos de sessenta dias de lesão (**A, B**) com mais de sessenta dias de lesão (**C, D**), estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml).

6.2.3 Correlação entre redução da produção de IFN- γ e de TNF- α pelo bloqueio de CD28-B7.

Quando o CTLA4 Ig foi utilizado para bloquear a interação CD28-B7 verificou-se que as reduções de IFN- γ e TNF- α eram concomitantes. Aqueles pacientes em que se observava uma diminuição na produção de IFN- γ também apresentavam uma redução de TNF- α nos sobrenadantes. Este resultado é demonstrado por uma correlação positiva entre a porcentagem da redução do IFN- γ e do TNF- α .

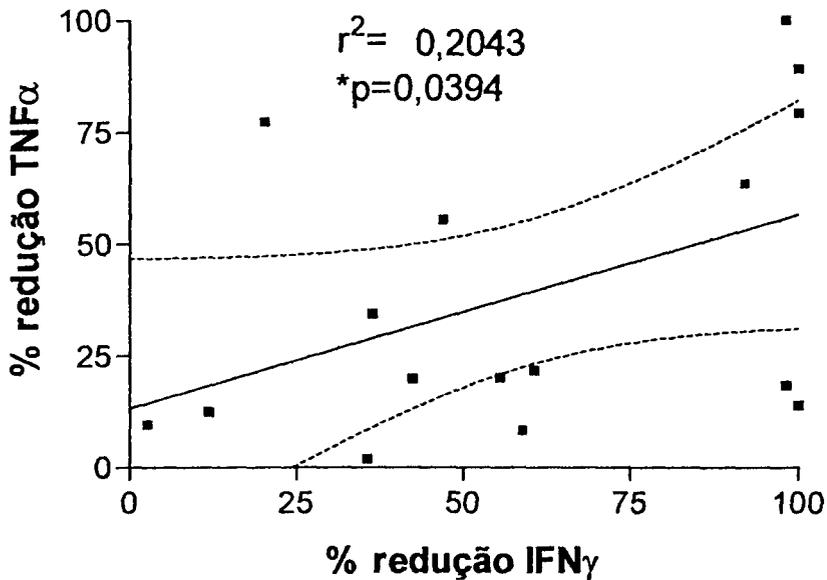


Figura 13 - Correlação positiva entre a porcentagem de redução de IFN- γ e porcentagem de redução de TNF- α quando a interação CD28-B7 foi bloqueada via CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

6.2.4 Produção de IL-12

Já que a produção de IFN- γ parece estar relacionada com a produção de IL-12, verificou-se a produção desta citocina nos sobrenadantes das culturas. Ao bloquear a via CD28-B7 pela utilização da molécula de CTLA4 Ig, houve também uma diminuição na produção desta citocina naqueles sobrenadantes com IL-12 detectável. Quando as CMSP foram estimuladas apenas com SLA, a produção de IL-12 foi de 40,21 pg/ml e esta produção caiu para 16,44 pg/ml por utilização de CTLA4 Ig, porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa. **FIGURA 14 (A, B)**

De um total de vinte e um pacientes que tiveram IL-12 testada nos sobrenadantes, apenas sete apresentaram esta citocina detectável. Deste, quatro (57%) apresentavam menos de sessenta dias de lesão e três (43%) apresentavam sessenta dias ou mais de lesão.

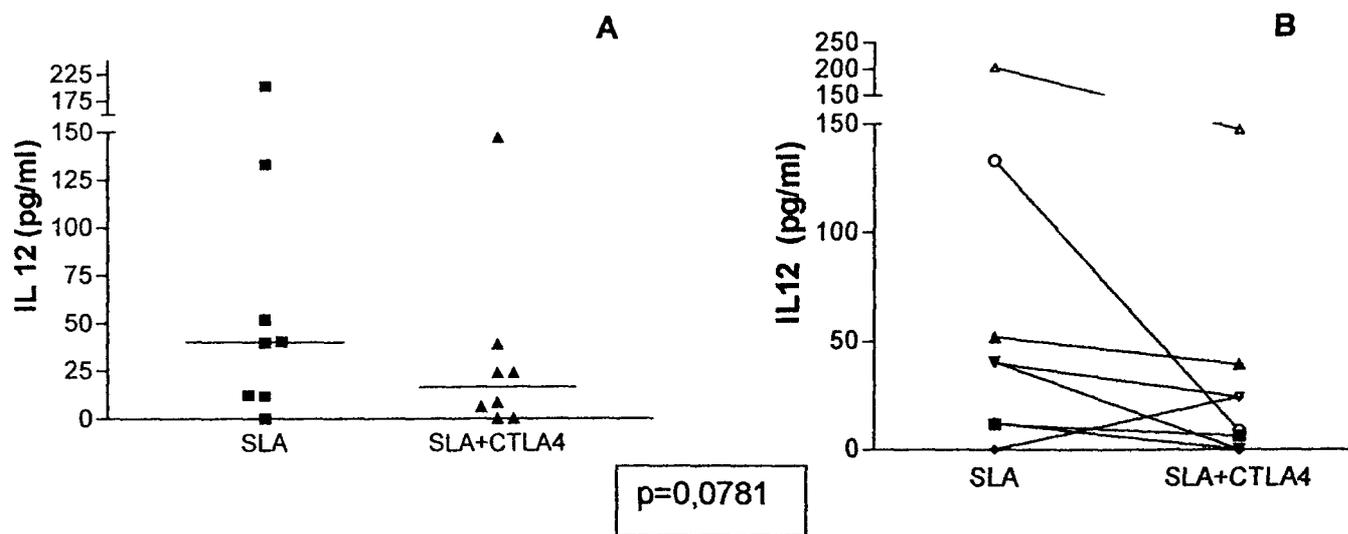


Figura 14 – Produção de IL-12 por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, estimuladas com SLA (10 μ g/ml) na presença de CTLA4 Ig (5 μ g/ml)

6.2.5 Produção de TGF- β

Após verificar-se uma diminuição das citocinas IFN- γ , IL-10 e TNF- α , avaliou-se a possibilidade do envolvimento do TGF- β nesta modulação generalizada quando a interação CD28-B7 foi bloqueada via CTLA4 Ig. De 12 sobrenadantes testados, TGF- β foi detectável em apenas quatro. Quando as CMSP de pacientes eram estimuladas somente com 10 μ g/ml de SLA a produção de TGF- β era muito baixa, gerando uma mediana de 2,3 pg/ml. Por outro lado, quando se utilizava o CTLA4 Ig 5 μ g/ml solúvel, esta produção aumentava para 21,3 pg/ml.

6.2.6 Teste com toxóide tetânico

Tendo como objetivo a confirmação de que os resultados encontrados pelo bloqueio de CD28-B7, via utilização de CTLA4 Ig, são específicos ao antígeno solúvel de *Leishmania*, foi realizado um teste com toxóide tetânico (TT). CMSP de quatro doadores imunizados foram obtidas por gradiente de Ficoll, reestimuladas *in vitro* com 5 LF/ml e os sobrenadantes foram coletados após 24, 48 e 96 horas de cultura para dosagem de TNF- α , IL-10 e IFN- γ , respectivamente, por ELISA. Os resultados obtidos demonstraram que a utilização de CTLA4 Ig não levou a uma diminuição significativa das citocinas mencionadas. A produção de IFN- γ foi de 795 pg/ml quando estimuladas apenas com TT e de 623,5 pg/ml na presença de CTLA4 Ig. ($p=0,125$)

FIGURA 15

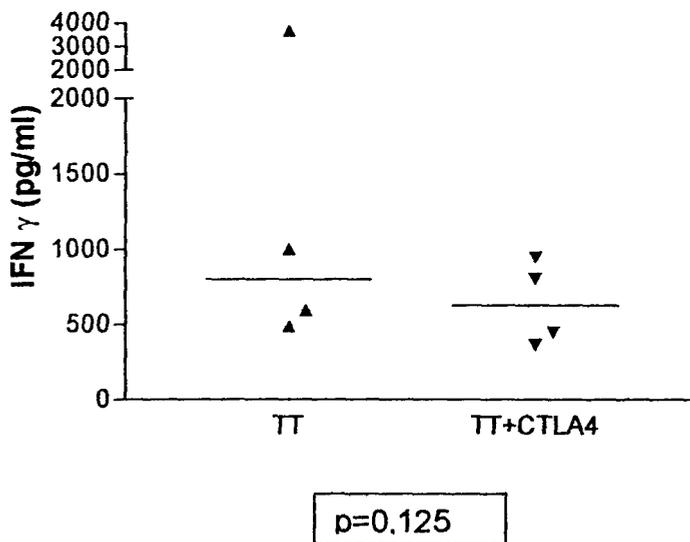


Figura 15 Produção de IFN- γ por CMSP de doadores reestimuladas *in vitro* com 5 LF/ml de toxóide tetânico.

Quanto à produção de IL-10, o estímulo com TT levou a uma produção de 441,5 pg/ml enquanto que a presença de CTLA4 Ig levou a uma produção de 419 pg/ml ($p=0,8750$)

FIGURA 16

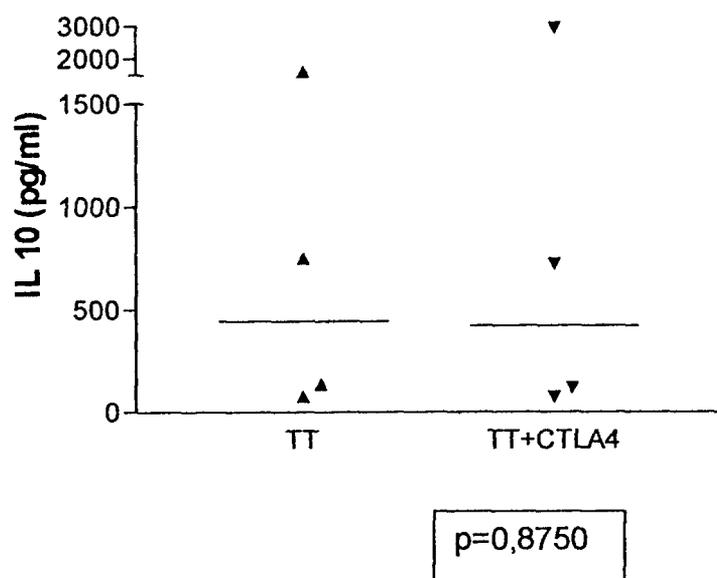


Figura 16 Produção de IL-10 por CMSP de doadores reestimuladas *in vitro* com 5 LF/ml de toxóide tetânico.

Quanto à produção de TNF- α , frente ao estímulo somente do TT a produção foi de 643,5 pg/ml e na presença de CTLA Ig de 472,5 pg/ml ($p=0,1250$)

FIGURA 17

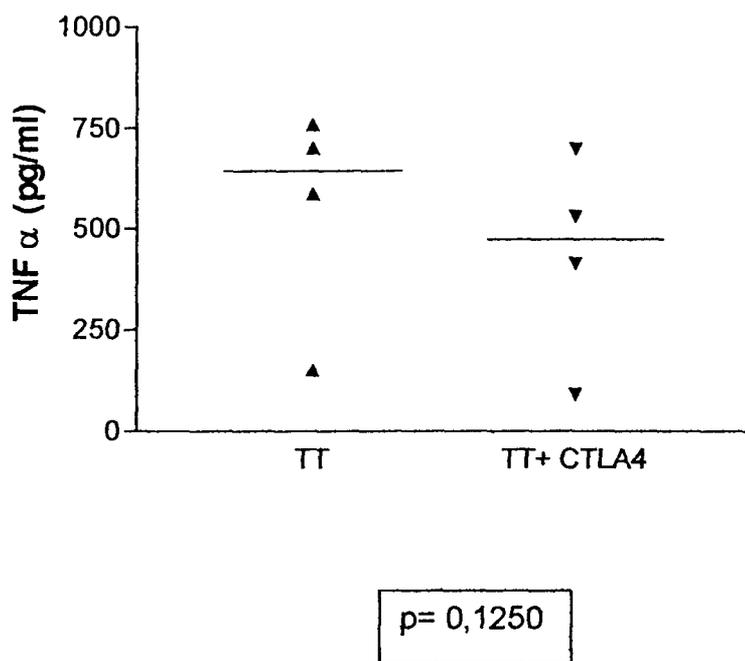


Figura 17 Produção de TNF- α por CMSP de doadores reestimuladas *in vitro* com 5 LF/ml de toxóide tetânico

6.3 Análise fenotípica por citometria de fluxo

As CMSP de um total de dez pacientes, escolhidos aleatoriamente (cinco com lesão recente e cinco com lesão tardia), após reestimulação *in vitro* foram analisadas fenotipicamente após 48 horas de cultura. Analisaram-se as populações CD4⁺ e CD8⁺ quanto a dois marcadores de ativação, CD25 e CTLA4. A figura 18 demonstra um gráfico “dot plot” gerado no citômetro de fluxo. Após marcação tripla, o quadrante superior direito foi analisado, representando a população com dupla marcação, que é a população de interesse. A figura 18 (A) demonstra no quadrante superior direito, a população de células T (janela R1) com dupla marcação para CD4⁺CD25⁺ totalizando 13,75% e em (B) a população de células T (janela R2) com dupla marcação para CD8⁺CD25⁺ totalizando 0,53%.

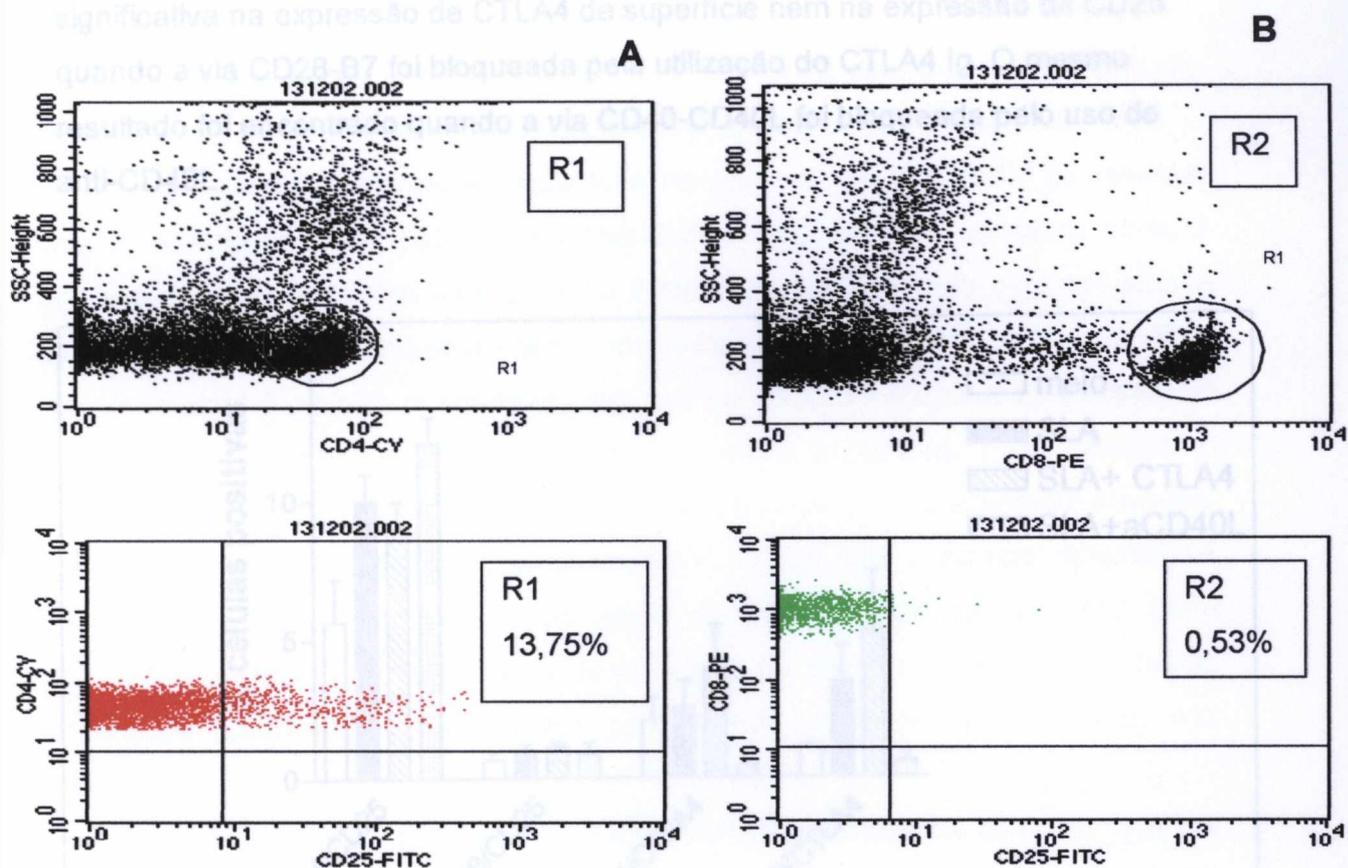


Figura 18 – “Dot plot” representativo gerado por citometria de fluxo. (A) População de células T (janela R1), mostrando dupla marcação para CD4⁺CD25⁺ e (B) População de células T (janela R2), mostrando dupla marcação para CD8⁺CD25⁺

Figura 19 - Análise por citometria de fluxo da população celular gerada após reatimulação *in vitro* de CMSP de pacientes com SLA (10µg/ml), na presença de CTLA4ig (5µg/ml) e anti CD40L (10µg/ml)

As populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ não demonstraram alteração significativa na expressão de CTLA4 de superfície nem na expressão de CD25 quando a via CD28-B7 foi bloqueada pela utilização do CTLA4 Ig. O mesmo resultado foi encontrado quando a via CD40-CD40L foi bloqueada pelo uso de anti-CD40L.

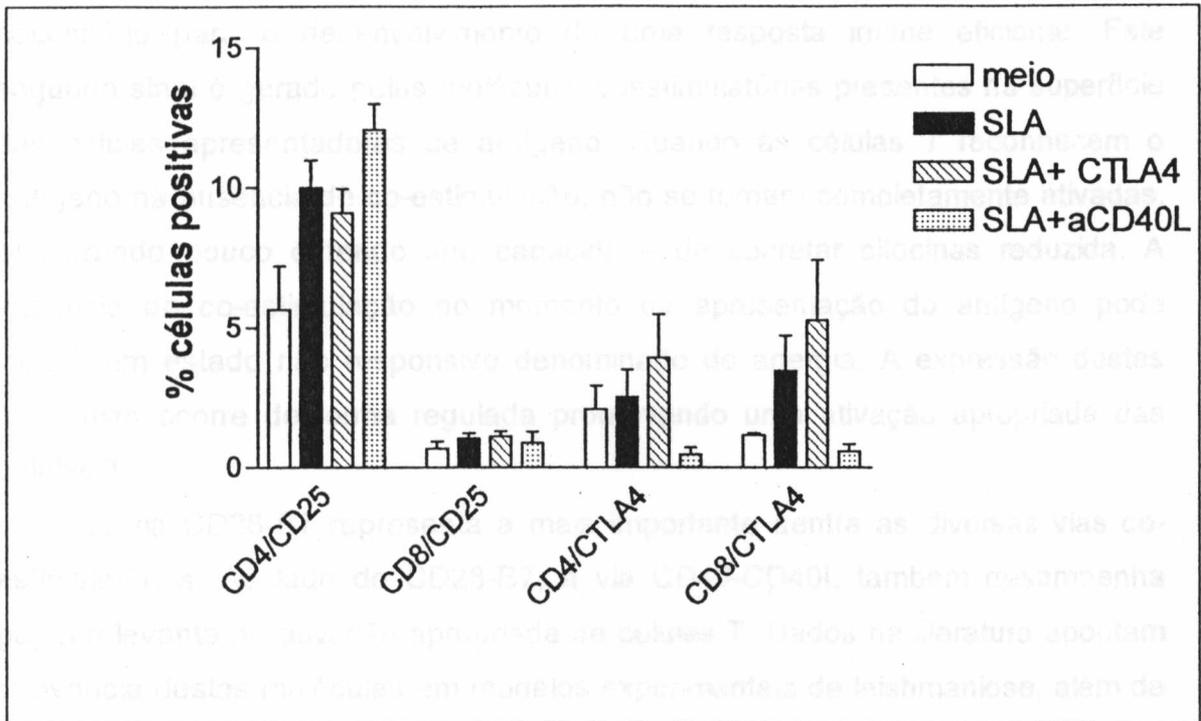


Figura 19 - Análise por citometria de fluxo da população celular gerada após reestimulação *in vitro* de CMSP de pacientes com SLA (10µg/ml), na presença de CTLA4Ig (5µg/ml) e anti CD40L (10µg/ml)

7 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo verificar a contribuição de moléculas coestimulatórias na imunomodulação da leishmaniose cutânea localizada.

As células T têm papel essencial no início e na regulação da resposta imune a antígeno. Já está bem estabelecido que além do primeiro sinal, o reconhecimento do antígeno associado à molécula do MHC, um segundo sinal é necessário para o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente. Este segundo sinal é gerado pelas moléculas coestimulatórias presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno. Quando as células T reconhecem o antígeno na ausência de co-estimulação, não se tornam completamente ativadas, proliferando pouco e tendo sua capacidade de secretar citocinas reduzida. A ausência de co-estimulação no momento da apresentação do antígeno pode induzir um estado não responsivo denominado de anergia. A expressão destas moléculas ocorre de forma regulada promovendo uma ativação apropriada das células T.

A via CD28-B7 representa a mais importante dentre as diversas vias coestimulatórias. Ao lado de CD28-B7, a via CD40-CD40L também desempenha papel relevante na ativação apropriada de células T. Dados na literatura apontam relevância destas moléculas em modelos experimentais de leishmaniose, além de outras doenças. Portanto, os objetivos deste trabalho consistem em verificar se o bloqueio destas vias implicaria em alterações no perfil da resposta imune de pacientes com leishmaniose cutânea localizada.

Para desenvolver o objetivo proposto, utilizou-se uma abordagem experimental baseada no estudo *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com a forma cutânea localizada da doença. Estas células foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) na presença de CTLA4 Ig (para bloqueio da via CD28-B7) ou de anti-CD40L (para bloqueio da via CD40-CD40L). Estudou-se o padrão de produção de citocinas bem como o padrão fenotípico celular gerado após estímulo *in vitro* e os respectivos bloqueios anteriormente citados.

Os resultados encontrados demonstram que a interação CD40-CD40L não foi essencial na imunomodulação das citocinas TNF- α , IL-10 e IFN- γ dentro da abordagem experimental *in vitro* utilizando CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada. Por outro lado, quando a interação CD28-B7 foi bloqueada pela utilização da molécula CTLA4 Ig, verificou-se uma diminuição significativa das citocinas TNF- α , IL-10 e IFN- γ . Visando um melhor esclarecimento, decidiu-se verificar outras citocinas que poderiam estar envolvidas também nesta imunomodulação. Para tanto, verificou-se também o que estaria acontecendo com a produção de IL-12 e TGF- β . Avaliando os sobrenadantes, apenas seis pacientes apresentaram células secretando IL-12 detectável, e nestes o bloqueio da via CD28-B7 levou a uma diminuição não significativa da produção de IL-12. Verificou-se um aumento na produção de TGF- β ativo em alguns dos sobrenadantes, cuja produção das citocinas IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ foi diminuída pelo bloqueio de CD28-B7.

Dados na literatura demonstram a importância da co-estimulação em diversos modelos experimentais. Zhou & Seder (1998) utilizando um modelo murino de infecção por *Histoplasma capsulatum*, verificaram que camundongos deficientes em CD40L não apresentavam aumento de mortalidade ou carga fúngica. Além disso, a expressão de RNAm para IL-12, IFN- γ , TNF- α e NO eram similares entre camundongos deficientes em CD40L e camundongos selvagens. Quando os camundongos deficientes eram tratados com anti-IFN- γ , havia aumento da mortalidade e carga fúngica, demonstrando que havia uma via independente de CD40L para produção de IFN- γ . Este dado é bastante interessante por se tratar de um modelo de doença semelhante à leishmaniose, no qual a resposta protetora é Th1, gerada pela produção de IFN- γ mediada por IL-12.

Já no modelo murino de lúpus eritematoso sistêmico, no qual a resposta Th2 é protetora, uma terapia combinada de CTLA4Ig e anti CD40 resultou numa disfunção renal mais tardia, diminuição na frequência de células B produtoras de anticorpos anti-DNA, uma inibição parcial de mudança de classe de isotipo e

inibição da ativação de células T, demonstrando a importância destas duas vias na imunopatogênese do lúpus (WANG et al, 2002). Assim, parece que o bloqueio da interação CD40-CD40L interfere com respostas do tipo Th1 e Th2.

Villegas et al, (2000) verificaram que camundongos deficientes em IL-10 infectados com *Toxoplasma gondii* não apresentavam alterações na expressão de B7 e CD40 em APC. Por outro lado, o bloqueio simultâneo destas moléculas protegia os camundongos por diminuir a produção de IFN- γ e iNOS, minimizando a inflamação e permitindo aos camundongos sobreviverem à fase aguda da doença. O mesmo grupo (WILLE et al, 2002) aprofundou seus estudos e verificou que camundongos deficientes em IL-10 tratados somente com anti IL-12 não apresentavam diminuição nos níveis séricos de IFN- γ . Porém, se CTLA4 Ig fosse utilizado concomitantemente a anti-IL-12, havia um aumento da sobrevivência e uma diminuição no IFN- γ sistêmico. Esta resposta também foi verificada quando as células foram reestimuladas *in vitro*. Portanto, na ausência de IL-10, IL-12 não é necessária para a produção de IFN- γ . Por outro lado, quando a interação CD40-CD40L era bloqueada com anti-CD40L, o efeito neste modelo era diferente. Os camundongos deficientes em IL-10 não apresentavam alterações na produção de IFN- γ , mesmo quando utilizava-se simultaneamente anti IL-12 e anti-CD40L por volta do sétimo dia pós infecção. Portanto, a produção de IFN- γ não requer sinalização via CD40-CD40L nem via IL-12 uma vez que a resposta imune já tenha sido iniciada. Conclui-se, portanto, que no modelo descrito neste trabalho, a interação CD28-B7 é suficiente para manter os níveis de IFN- γ de forma independente de CD40-CD40L e de IL-12.

Os resultados encontrados com CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, demonstram que o bloqueio da interação CD28-B7 levou a uma modulação negativa geral, levando a uma diminuição das citocinas IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ . Porém, não houve alterações significativas quando a interação CD40-CD40L foi bloqueada pela utilização de anti-CD40L.

Por outro lado, verificou-se que o nível de expressão de CD40 e CD40L em lesões de pacientes causadas por *Mycobacterium leprae* se correlacionava com a

resposta imune mediada por células. Lesões tuberculóides expressavam mais CD40 e CD40L do que lesões lepromatosas. CMSP de pacientes com a forma tuberculóide proliferavam mais e tinham uma expressão de CD40L aumentada quando reestimuladas *in vitro* com antígeno específico. Já CMSP de pacientes com forma lepromatosa apresentavam proliferação e expressão de CD40L baixas. A produção de IL-12 por CMSP de pacientes com a forma tuberculóide era parcialmente dependente de CD40-CD40L, porém, a produção desta citocina era CD40-CD40L independente em pacientes com a forma lepromatosa da doença. (YAMAUCHI et al, 2000)

A via coestimulatória CD40-CD40L também tem sido bastante estudada em relação à leishmaniose. A maior parte dos trabalhos foi desenvolvida utilizando modelos experimentais murinos da doença. Utilizando um modelo de infecção por *L. major*, Ferlin et al (1998), observaram que camundongos BALB/c tratados *in vivo* com anti-CD40L desenvolviam uma resposta protetora dependente de células T e esta proteção ocorria por aumento de IL-12 e IFN- γ . Heinzl et al, (1998), utilizando o modelo murino de infecção por *L. major* com a linhagem resistente C57/BL6, concluíram que a interação CD40-CD40L era essencial para a cura, via produção de IL-12. Os autores verificaram também que o tratamento com anti-CD40L diminuía a produção de IFN- γ dependente de IL-12, tanto na linhagem susceptível quanto na linhagem resistente. O mais interessante foi que a frequência de células CD40⁺ produtoras de IL-12 nos camundongos susceptíveis era significativamente menor. Mais recentemente Padigel & Farrel (2003), fizeram uso de camundongos deficientes em CD40L e observaram que estes eram capazes de produzir IL-12 suficiente para promover resistência à *L. major*, quando a infecção era feita com baixas doses de parasitos. Esta observação levou à conclusão de que é possível se desenvolver uma resposta protetora Th1 independente da ativação via CD40. (PADIGEL & FARREL, 2003)

Estes dados demonstram que a interação CD40-CD40L pode não ser essencial para a modulação da resposta em modelos murinos de leishmaniose. Vale ressaltar que esta dependência ou não da co-estimulação CD40-CD40L está diretamente relacionada com o início da infecção. Este fato difere dos resultados

aqui demonstrados, pois além de fazermos uso de uma abordagem *in vitro* com CMSP de pacientes, aborda a modulação da resposta em um momento onde a doença já está estabelecida.

O padrão de produção de citocinas por CMSP de pacientes com a forma clássica da leishmaniose cutânea localizada já está bem descrito na literatura. Citocinas como o IFN- γ e o TNF- α , são essenciais para o controle da multiplicação do parasito ativando macrófagos de maneira autócrina (como o TNF- α) ou de forma dependente de células T, neste caso o IFN- γ (MURRAY et al, 1983). Por outro lado, estas citocinas também contribuem para a patogênese da leishmaniose tegumentar quando produzidas de forma crônica ou intensa. Confirmando este fato, Ribeiro-de-Jesus et al, (1998) verificaram que CMSPs de pacientes com leishmaniose cutânea mucosa, quando estimulados com *L. amazonensis*, apresentam um aumento de IFN- γ e TNF- α no sobrenadante da cultura. Desta forma, o IFN- γ estaria envolvido na patogênese da doença por levar a um aumento do TNF- α . (RIBEIRO-DE-JESUS et al, 1998). Na forma localizada da doença, são detectados altos níveis destas citocinas nos sobrenadantes de CMSP, porém, esta produção é ainda maior no caso se pacientes com leishmaniose cutâneo mucosa. (BACELLAR et al, 2002).

Por outro lado, apesar da liberação destas citocinas pró-inflamatórias, muitos parasitos permanecem intactos dentro dos macrófagos. Isto pode ser devido a presença de outras substâncias que contrabalançam a ação do IFN- γ , como IL-4, IL-10 ou TGF- β , o qual tem sido demonstrado predominar em animais susceptíveis (BARRAL-NETTO et al, 1992). Na situação aqui descrita, a produção de citocinas com efeitos antagônicos aos do IFN- γ e TNF- α , como a IL-10 torna-se importante, pois esta irá exercer uma atividade imunomodulatória, atenuando os fatores patogênicos da doença cutânea.

Os resultados obtidos demonstram, tanto por dosagem de citocinas no sobrenadante quanto pela caracterização fenotípica celular, que a co-estimulação CD40-CD40L não é essencial para a resposta à infecção por *Leishmania* nesta forma clínica da doença humana. Isto ficou bem demonstrado na constatação de

não haver diferença significativa na produção de TNF- α , IL-10 e IFN- γ quando a interação CD40-CD40L foi bloqueada, via anti-CD40L, nos sobrenadantes das culturas de CMSP estimuladas com SLA.

Estes dados tem relação com aqueles de Padigel & Farrell, (2003), que demonstram que esta interação não é essencial ao desenvolvimento e modulação de uma resposta Th1 na leishmaniose murina. Por outro lado, Brodskyn et al, (2001) verificaram que o IFN- γ sofria modulação negativa, independente de IL-10, quando anti-CD40L era utilizado no modelo de sensibilização *in vitro* de células humanas por *L. major*. Deve-se ressaltar o fato da *L. braziliensis* ser o agente etiológico da leishmaniose cutânea localizada na área endêmica aqui estudada. Esta pode ser a causa da aparente contradição entre os dados aqui encontrados e aqueles de Brodskyn et al (2001). Vale ressaltar que os resultados encontrados por esses autores se referem a eventos iniciais da infecção enquanto que a abordagem aqui descrita utiliza CMSP de pacientes com a doença já estabelecida.

Em alguns casos, os valores de IL-10 encontrados nos sobrenadantes das culturas de CMSP destes pacientes foram muito baixos (menor que 15 pg/ml) dificultando a interpretação dos dados. Ajdary et al (2000) estudando pacientes com leishmaniose tegumentar causada por *L. major*, demonstraram níveis de IL-10 indetectáveis nos sobrenadantes das culturas de CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar. (AJDARY et al, 2000)

Quanto à caracterização fenotípica celular das populações CD4⁺ e CD8⁺ quanto aos marcadores de ativação avaliados (CD25 e CTLA4), esta parece também não ter sofrido modulação pela via CD 40 - CD40L, pois não houve diferença significativa na frequência celular quando a via foi bloqueada com anti-CD40L. Após estímulo com SLA, na presença de anti-CD40L, não houve alteração no marcador de ativação celular precoce CD25 (receptor de IL-2) nem na expressão de CTLA4 na superfície celular, tanto em CD4⁺ quanto em CD8⁺.

Elloso & Scott (1999), ao tratarem camundongos BALB/c e C3H infectados com *L. major* com CTLA4 Ig, verificaram que durante a reestimulação *in vitro* havia diminuição na produção de IL-4 e IFN- γ no sobrenadante das culturas, respectivamente. Além disso, observou-se também a diminuição na

linfoproliferação e este efeito era predominantemente causado pelo bloqueio de B7-2. Estes resultados demonstram que a interação CD-28/ B7-2 é essencial para a resposta imune inicial à infecção por *L. major*, sendo esta dependente do nível de expressão de B7-1 nas células apresentadoras de antígeno, Brodskyn et al, (2001) também reforçam o fato do IFN- γ estar sofrendo modulação negativa num mecanismo independente de IL-10. Utilizando um modelo de sensibilização *in vitro* de células humanas por *L. major*, estes autores concluíram que a presença de CTLA4 Ig diminuía a produção de IFN- γ e IL-5 abaixo dos níveis detectáveis. Estudando individualmente B7-1 e B7-2, verificou-se que este efeito na diminuição do IFN- γ foi mais pronunciado quando a molécula B7-2 era bloqueada. Novamente, não houve alteração alguma na produção de IL-10 quando as interações CD28/ B7-1 e CD28/ B7-2 eram bloqueadas. Padigel & Farrell, (2003) ao utilizarem baixos inóculos de *L. major* para infectar camundongos BALB/c deficientes em CD28 constataram que estes camundongos passaram a se tornar resistentes à infecção e também a um desafio posterior. Este perfil de resistência se dava por mecanismo dependente de IFN- γ e de células T CD4⁺. Neste trabalho, portanto, evidenciou-se a importância da co-estimulação via CD28-B7 ao desenvolvimento de resposta Th2 em modelo murino de leishmaniose tegumentar.

Quando a molécula de CTLA4 Ig foi utilizada para bloqueio da interação CD28-B7 na abordagem *in vitro* utilizando CMSP de pacientes, verificou-se ocorrer uma diminuição significativa tanto na produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10. Foi encontrada uma correlação positiva quanto à porcentagem de redução de IFN- γ e TNF- α nos sobrenadantes, ou seja, a modulação negativa destas duas citocinas está relacionada. Na maioria dos sobrenadantes, não foi possível evidenciar produção de IL-12. Quando esta citocina era detectável, sofria uma modulação negativa, porém não significativa pelo bloqueio de CD28-B7 via CTLA4 Ig. Uma possível explicação seria que esta modulação de citocinas pró inflamatórias ocorra via TGF- β , pois esta citocina está envolvida com reativação de infecção latente por *L. braziliensis* em modelos murinos e também há aumento de replicação de *L. braziliensis* quando TGF- β é adicionado a culturas de macrófagos

(BARRAL et al, 1993). A importância do TGF- β também foi bastante evidenciada no calazar murino, onde o bloqueio de CTLA4 via anti-CTLA4 levava a uma diminuição do TGF- β , restaurando a produção de IFN- γ . O bloqueio de CTLA4 e a neutralização de TGF- β levavam a eliminação de *L. chagasi* por fazer com que células T CD4⁺ antígeno específicas produzam IFN- γ , que por sua vez ativa macrófagos levando à destruição os parasitos. (GOMES et al, 2000). No que concerne aos nossos resultados, o TGF- β ativo foi dosado e detectado em alguns sobrenadantes, nos quais o uso de CTLA4 Ig resultou num aumento desta citocina. Este é um dado interessante que pode explicar a modulação negativa encontrada nas citocinas IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ . Porém estes dados precisam ser confirmados pela ampliação do número dosagens de TGF- β nos sobrenadantes ou pela tentativa de reversão desta resposta através do bloqueio de TGF- β .

Nos resultados encontrados, também chamou atenção o fato de que as citocinas TNF- α e IFN- γ diminuía de forma mais significativa naqueles pacientes com lesões mais recentes ou seja, naqueles pacientes que relatavam menos de sessenta dias de lesão no momento do atendimento. Isto reforça o fato de que a modulação aqui encontrada ocorre principalmente durante o início do desenvolvimento da doença. Rocha et al, (1999), constataram diferenças na resposta imune celular de pacientes com menos e mais de sessenta dias de lesão. Dentre estas diferenças, CMSP de pacientes com 15 dias de lesão apresentavam uma imunossupressão transitória, com baixa produção de IFN- γ e alta produção de IL-10. Por outro lado, nas CMSP de pacientes com lesão mais tardia (mais de sessenta dias), a produção de IL-10 diminuía bastante, enquanto que a produção de IFN- γ aumentava. Este dado está de acordo com os dados aqui descritos e reforçam o fato de que a citocina IL-10 tenha sido indetectável em alguns pacientes, já que o grupo aqui estudado apresenta um tempo de lesão médio de 55 dias.

Quando Rocha et al, (1999) realizaram o bloqueio de IL-10 nas células de pacientes com 15 dias de lesão, a produção de IFN- γ foi

restaurada, demonstrando a importância da IL-10 nesta imunossupressão inicial encontrada nos pacientes com LTA precoce .

Diante dos dados aqui encontrados, verificou-se que a interação CD40-CD40L não é essencial para a modulação da resposta imune utilizando uma abordagem experimental *in vitro* com CMSP de pacientes com a forma tegumentar localizada da doença. Isto foi evidenciado por não haver alteração na produção de IFN- γ , IL-10, IL-12 e TNF - α nos sobrenadantes das culturas. Analisando-se o padrão fenotípico celular, também não foram constatadas alterações significativas nas populações celulares de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Por outro lado, a interação CD28-B7 parece ter uma importância mais pronunciada nesta abordagem *in vitro* da leishmaniose cutânea localizada. Quando esta via foi bloqueada pela utilização de CTLA4 Ig houve uma diminuição das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-12 e TNF- α nos sobrenadantes destas culturas. Partindo-se para a análise fenotípica destas células, verificou-se não haver alteração no padrão fenotípico de células T CD4⁺ e CD8⁺. Buscando uma melhor compreensão deste mecanismo imunomodulatório atribuído à via CD28-B7, verificou-se elucidar a produção do TGF- β , já que esta citocina está envolvida num aumento de replicação de *L. braziliensis* em cultura de macrófagos humanos (BARRAL et al, 1995c) e sua neutralização causa um aumento de IFN- γ no calazar murino (GOMES et al, 2000). Quando CTLA4 Ig foi utilizado nas culturas de CMSP de pacientes, verificou-se um aumento da produção desta citocina naqueles sobrenadantes com produção de TGF- β detectável. Porém, como já foi citado anteriormente, estes dados precisam ser ampliados em número para uma melhor consistência dos resultados.

A resposta observada em nosso estudo sugere que a interação CD28-B7 é essencial para a produção de diferentes citocinas, principalmente por CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar apresentando lesões com duração inferior a sessenta dias. Por outro lado, não se verificou imunomodulação *in vitro* quando avaliou-se CMSP de pacientes com tempo de lesão superior a sessenta dias.

8 CONCLUSÕES

1. A interação CD 40 - CD40L não teve papel essencial na modulação das citocinas IFN- γ , IL-10 e TNF- α por CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada.
2. A interação CD28-B7 é importante neste modelo *in vitro* de leishmaniose tegumentar, tendo seu bloqueio modulado a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-12 de uma forma mais significativa no grupo de pacientes com menos de sessenta dias de lesão.
3. Não houve alteração na ativação de células CD4⁺ e CD8⁺ quando as interações CD28-B7 e CD40-CD40L foram bloqueadas.

9 REFERÊNCIAS

AJDARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, M.H.; ESLAMI, M.B.; KEMP, K.; KHARAZMI, A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun*, **68**:1760-1764, 2000.

AKUFFO, H.; SCHURR, E.; ANDERSSON, G.; YAMANEBERHAN, T.; BRITTON, S. Responsiveness in diffuse versus local cutaneous leishmaniasis is due to parasite differences. *Scand J Immunol*, **26**:717-721, 1987.

ALEGRE, M.L.; NOEL, P.J.; EISFELDER, B.J.; CHUANG, E.; CLARK, M.R.; REINER, S.L.; THOMPSON, C.B. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J Immunol*, **157**:4762-4770, 1996.

ANDRADE, Z.A.; REED, S.G.; ROTERS, S.B. ; SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol*, **114**:137-148, 1984.

BACELLAR, O.;LESSA, H.;SCHRIEFER, A.;MACHADO, P.;RIBEIRO DE JESUS, A.;DUTRA, W. O.;GOLLOB, K. J.;CARVALHO, E. M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*, **70**:6734-40, 2002

BADARO, R; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D., JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, **154**:1003-1011, 1986.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; ALMEIDA, R.; DE JESUS, A.R.; GRIMALDI JUNIOR, G.; NETTO, E.M.; SANTOS, I.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **Am J Trop Med Hyg**, 47:587-592, 1992.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90:3442-3446, 1993.

BARRAL, A.; COSTA, J.M.; BITTENCOURT, A.L.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int J Dermatol**, 34:474-479, 1995a.

BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; BOMFIM, G.; CORREIA, D.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am J Trop Med Hyg**, 53:256-259, 1995b.

BARRAL, A.; TEIXEIRA, M.; REIS, P.; VINHAS, V.; COSTA, J.; LESSA, H.; BITTENCOURT, A. L.; REED, S.; CARVALHO, E. M.; BARRAL-NETTO, M. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. **Am J Pathol**, 147:947-54, 1995c

BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg**, **44**:536-546, 1991.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A.; ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, **257**:545-548, 1992.

BARRAL-NETTO, M.; DA SILVA, J.S.; BARRAL, A.; REED, S. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. **Am J Pathol**, **146**:635-642, 1995.

BARRAL-NETTO, M.; DE FREITAS, L.A.; ANDRADE, Z.A. Histopathologic changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. **Am J Pathol**, **127**:271-278, 1987.

BIRKLAND, T.P.; SYPEK, J.P. ; WYLER, D.J. Soluble TNF and membrane TNF expressed on CD4+ T lymphocytes differ in their ability to activate macrophage antileishmanial defense. **J Leukoc Biol**, **51**:296-299, 1992.

BITTENCOURT, A.L.; COSTA, J.M.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A. Leishmaniasis recidiva cutis in American cutaneous leishmaniasis. **Int J Dermatol**, **32**:802-805, 1993.

BITTENCOURT, A.L.; SODRE, A.; ANDRADE, Z.A. [Detection of circulating antibodies by the immunofluorescence method in cutaneous leishmaniasis]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 10:247-252, 1968.

BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E. M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Exp Parasitol**, 84:188-94,1996

BRODSKYN, C.I.; DEKREY, G.K.; TITUS, R.G. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells *in vitro*. **Infect Immun**, 69:665-672, 2001.

BRUNET, J.F.; DENIZOT, F.; LUCIANI, M.F.; ROUX-DOSSETO, M.; SUZAN, M.; MATTEI, M.G.; GOLSTEIN, P. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. **Nature**, 328:267-270, 1987.

BRYCESON, A.D. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The clinical and histological features of the disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 83:708-737, 1969.

CAMPBELL, K.A.; OVENDALE, P.J.; KENNEDY, M.K.; FANSLOW, W.C.; REED, S.G.; MALISZEWSKI, C.R. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. **Immunity**, 4:283-289, 1996.

CARVALHO, E.M.; BADARO, R.; REED, S.G.; JONES, T.C.; JOHNSON, W.D., JR. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J Clin Invest**, **76**:2066-2069, 1985.

CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop**, **56**:315-325, 1994.

CARVALHO, E.M.; CORREIA FILHO, D.; BACELLAR, O.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; ROCHA, H. Characterization of the immune response in subjects with SELF-HEALING CUTANEOUS LEISHMANIASIS. **AM J TROP MED HYG**, **53**:273-277, 1995.

CASTES, M.; AGNELLI, A.; RONDON, A.J. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, **57**:279-286, 1984.

CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O. ; RONDON, A.J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin Immunol Immunopathol**, **27**:176-186, 1983.

CONVIT, J.; PINARDI, M.E.; RONDON, A.J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, **66**:603-610, 1972.

CORRY, D.B.; REINER, S.L.; LINSLEY, P.S.; LOCKSLEY, R.M. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. **J Immunol**, **153**:4142-4148, 1994.

COSTA, J.M.; MARSDEN, P.D.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; NETTO, E.M.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; ROSA, A.C.; CUBA, C.C.; MAGALHAES, A.V.; BARRETO, A.C. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **J Trop Med Hyg**, **89**:319-323, 1986.

DA-CRUZ, A. M.; DE OLIVEIRA, M. P.; DE LUCA, P. M.; MENDONCA, S. C.; COUTINHO, S. G. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **91**:225-229, 1996.

DARIAVACH, P.; MATTEI, M.G.; GOLSTEIN, P.; LEFRANC, M.P. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. **Eur J Immunol**, **18**:1901-1905, 1988.

DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; DONHAUSER, N.; LORENZ, E.; LASKAY, T.; MACMICKING, J.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**, **8**:77-87, 1998.

DUJARDIN, J.C.; LLANOS-CUENTAS, A.; CACERES, A.; ARANA, M.; DUJARDIN, J.P.; GUERRINI, F.; GOMEZ, J.; ARROYO, J.; DE DONCKER, S.; JACQUET, D. Molecular karyotype variation in *Leishmania (Viannia) peruviana*:

indication of geographical populations in Peru distributed along a north-south cline. **Ann Trop Med Parasitol**, **87**:335-347, 1993.

ELLOSO, M.M.; SCOTT, P. Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. **J Immunol**, **162**:6708-6715, 1999.

FERLIN, W.G.; VON DER WEID, T.; COTTREZ, F.; FERRICK, D.A.; COFFMAN, R.L. ; HOWARD, M.C. The induction of a protective response in *Leishmania major*-infected BALB/c mice with anti-CD40 mAb. **Eur J Immunol**, **28**:525-531, 1998.

FOY, T.M.; ARUFFO, A.; BAJORATH, J.; BUHLMANN, J.E.; NOELLE, R.J. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. **Annu Rev Immunol**, **14**:591-617, 1996.

GASPARI, A.A.; JENKINS, M.K.; KATZ, S.I. Class II MHC-bearing keratinocytes induce antigen-specific unresponsiveness in hapten-specific Th1 clones. **J Immunol**, **141**:2216-2220, 1988.

GOMES, N.A.; BARRETO-DE-SOUZA, V.; WILSON, M.E.; DOSREIS, G.A. Unresponsive CD4+ T lymphocytes from *Leishmania chagasi*-infected mice increase cytokine production and mediate parasite killing after blockade of B7-1/CTLA-4 molecular pathway. **J Infect Dis**, **178**:1847-1851, 1998.

GOMES, N.A.; GATTASS, C.R.; BARRETO-DE-SOUZA, V.; WILSON, M.E. ; DOSREIS, G.A. TGF-beta mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. **J Immunol**, **164**:2001-2008, 2000.

GREENFIELD, E.A.; HOWARD, E.; PARADIS, T.; NGUYEN, K.; BENAZZO, F.; MCLEAN, P.; HOLLSBERG, P.; DAVIS, G.; HAFLER, D.A.; SHARPE, A.H.; FREEMAN, G.J.; KUCHROO, V.K. B7.2 expressed by T cells does not induce CD28-mediated costimulatory activity but retains CTLA4 binding: implications for induction of antitumor immunity to T cell tumors. **J Immunol**, **158**:2025-2034, 1997.

GRIMALDI, G. [Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **77**:195-215, 1982.

GRIMALDI, G.; TESH, R.B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg**, **41**: 687-725., 1989.

GROSS, J.A.; CALLAS, E.; ALLISON, J.P. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. **J Immunol**, **149**:380-388, 1992.

GUENOUN, F.Z.; DOUKAN, S.; BOUREE, P.; VIEILLEFOND, A. [A diffuse and persistent skin eruption in an immunosuppressed patient]. **Ann Pathol**, **10**:365-366, 1990.

HARPER, K.; BALZANO, C.; ROUVIER, E.; MATTEI, M.G.; LUCIANI, M.F. ; GOLSTEIN, P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. **J Immunol**, **147**:1037-1044, 1991.

HEINZEL, F.P.; RERKO, R.M.; HUJER, A.M. Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity. **Cell Immunol**, **184**:129-142, 1998.

HOWARD, J.G.; HALE, C.; LIEW, F.Y. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. III. Nature and significance of specific suppression of cell-mediated immunity in mice highly susceptible to *Leishmania tropica*. **J Exp Med**, **152**:594-607, 1980.

JACOBS, T.; GRAEFE, S.E.; NIKNAFS, S.; GAWORSKI, I.; FLEISCHER, B. Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade. **J Immunol**, **169**:2323-2329, 2002.

JONES-CARSON, J.; VAZQUEZ-TORRES, A.; VAN DER HEYDE, H.C.; WARNER, T.; WAGNER, R.D. ; BALISH, E. Gamma delta T cell-induced nitric oxide production enhances resistance to mucosal candidiasis. **Nat Med**, **1**:552-557, 1995.

JUNE, C.H.; BLUESTONE, J.A.; NADLER, L.M.; THOMPSON, C.B. The B7 and CD28 receptor families. **Immunol Today**, **15**:321-331, 1994.

KEHRY, M.R. CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *J Immunol*, **156**:2345-2348, 1996.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J.J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **82**:421-424, 1987.

LINDSTEN, T.; LEE, K.P.; HARRIS, E.S.; PETRYNIAK, B.; CRAIGHEAD, N.; REYNOLDS, P.J.; LOMBARD, D.B.; FREEMAN, G.J.; NADLER, L.M.; GRAY, G.S. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol*, **151**:3489-3499, 1993.

LINSLEY, P.S.; BRADY, W.; URNES, M.; GROSMIRE, L.S.; DAMLE, N.K.; LEDBETTER, J.A. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*, **174**:561-569, 1991.

LINSLEY, P.S.; GREENE, J.L.; BRADY, W.; BAJORATH, J.; LEDBETTER, J.A.; PEACH, R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*, **1**:793-801, 1994.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **80**:859-876, 1986.

MAUEL, J.; BEHIN, R.; LOUIS, J. *Leishmania enriettii*: immune induction of macrophage activation in an experimental model of immunoprophylaxis in the mouse. **Exp Parasitol**, **52**:331-345, 1981.

MELBY, P.C.; ANDRADE-NARVAEZ, F.; DARNELL, B.J.; VALENCIA-PACHECO, G. In situ expression of interleukin-10 and interleukin-12 in active human cutaneous leishmaniasis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, **15**:101-107, 1996.

MELBY, P.C.; ANDRADE-NARVAEZ, F.J.; DARNELL, B.J.; VALENCIA-PACHECO, G.; TRYON, V.V.; PALOMO-CETINA, A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun**, **62**:837-842, 1994.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, **7**:145-173, 1989.

MOSSER, D.M. Receptors on phagocytic cells involved in microbial recognition. **Immunol Ser**, **60**: 99-114, 1994.

MURPHY, M.L.; COTTERELL, S.E.; GORAK, P.M.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. **J Immunol**, **161**:4153-4160, 1998.

MURPHY, M.L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E.N.; HUNTER, C.A.; FARRELL, J.P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **Eur J Immunol**, **31**:2848-2856, 2001.

MURRAY, H.W.; RUBIN, B.Y.; CARRIERO, S.; ACOSTA, A.M. Reversible defect in antigen-induced lymphokine and gamma-interferon generation in cutaneous leishmaniasis. **J Immunol**, **133**:2250-2254, 1984.

MURRAY, H.W.; RUBIN, B.Y.; ROTHERMEL, C.D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. **J Clin Invest**, **72**:1506-1510, 1983.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Faseb J**, **6**:3051-3064, 1992.

PADIGEL, U.M.; FARRELL, J.P. CD40-CD40 Ligand Costimulation Is Not Required for Initiation and Maintenance of a Th1-Type Response to *Leishmania major* Infection. **Infect Immun**, **71**:1389-1395, 2003.

PADIGEL, U. M.; PERRIN, P. J.; FARRELL, J. P. The development of a Th1-type response and resistance to *Leishmania major* infection in the absence of CD40-CD40L costimulation. **J Immunol**, **10**:5874-9, 2001.

PARSONS, K.R.; YOUNG, J.R.; COLLINS, B.A.; HOWARD, C.J. Cattle CTLA-4, CD28 and chicken CD28 bind CD86: MYPPPY is not conserved in cattle CD28. **Immunogenetics**, **43**:388-391, 1996.

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEICAO-SILVA, F.; MODLIN, R.L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J Clin Invest**, **91**:1390-1395, 1993.

PISA, P.; GENNENE, M.; SODER, O.; OTTENHOFF, T.; HANSSON, M.; KIESSLING, R. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. **J Infect Dis**, **161**:988-991, 1990.

POMPEU, M.; FREITAS, A.L.; DOSREIS, G.A.; BARRAL-NETTO, M. T-lymphocytes in experimental *Leishmania amazonensis* infection: comparison between immunized and naive BALB/c mice. **Parasitol Res**, **78**:16-22, 1992.

POMPEU, M.L.; FREITAS, L.A.; SANTOS, M.L.; KHOURI, M.; BARRAL-NETTO, M. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. **Acta Trop**, **48**:185-193, 1991.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major* **Annu Rev Immunol**, **13**:151-77, 1995

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, **31**:143-148, 1998.

ROCHA, P.N.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; DE JESUS, A.R.; FILHO, D.C.; FILHO, A.C.; BARRAL, A.; COFFMAN, R.L.; CARVALHO, E.M. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis**, **180**:1731-1734, 1999.

ROMAGNANI, S. Role for CD30 antigen in human T helper 2-type responses. **Ciba Found Symp**, **195**:55-62; discussion 62-57, 1995.

SARAVIA, N.G.; VALDERRAMA, L.; LABRADA, M.; HOLGUIN, A.F.; NAVAS, C.; PALMA, G.; WEIGLE, K.A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **J Infect Dis**, **159**:725-735, 1989.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R.L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J Exp Med**, **168**:1675-1684, 1988.

SHIRATORI, T.; MIYATAKE, S.; OHNO, H.; NAKASEKO, C.; ISONO, K.; BONIFACINO, J.S.; SAITO, T. Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. **Immunity**, **6**:583-589, 1997.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.E.; SOUZA, A.A. [Cutaneous leishmaniasis in Amazonia: isolation of *Leishmania (Viannia) lainsoni* from the rodent Agouti paca (Rodentia: Dasyproctidae), in the state of Para, Brazil]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, **33**:18-22, 1991.

THEODOS, C.M.; POVINELLI, L.; MOLINA, R.; SHERRY, B.; TITUS, R.G. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis *in vivo*. **Infect Immun**, **59**:2839-2842, 1991.

TITUS, R.G.; SHERRY, B. ; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med**, **170**:2097-2104, 1989.

VILLEGAS, E. N.; WILLE, U.; CRAIG, L; LINSLEY, P.S.; RENNICK, D.M.; PEACH, R.; HUNTER, C.A. Blockade of costimulation prevents infection-induced immunopathology in interleukin-10-deficient mice. **Infect Immun**, **68**:2837-2844, 2000

WALTON, B.C.; INTERMILL, R.W.; HAJDUK, M.E. Differences in biological characteristics of three *Leishmania* isolates from patients with espundia. **Am J Trop Med Hyg**, **26**:850-855, 1977.

WALUNAS, T.L.; BAKKER, C.Y.; BLUESTONE, J.A. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. **J Exp Med**, **183**:2541-2550, 1996.

WALUNAS, T.L.; LENSCHOW, D.J.; BAKKER, C.Y.; LINSLEY, P.S.; FREEMAN, G.J.; GREEN, J.M.; THOMPSON, C.B. ; BLUESTONE, J.A. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. **Immunity**, 1:405-413, 1994.

WANG, X.; HUANG, W.; MIHARA, M.; SINHA, J.; DAVIDSON, A. Mechanism of action of combined short-term CTLA4Ig and anti-CD40 ligand in murine systemic lupus erythematosus. **J Immunol**, 168:2046-2053, 2002.

WATERHOUSE, P.; PENNINGER, J.M.; TIMMS, E.; WAKEHAM, A.; SHAHINIAN, A.; LEE, K.P.; THOMPSON, C.B.; GRIESSER, H. ; MAK, T.W. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. **Science**, 270:985-988, 1995.

WEISER, W.Y.; VAN NIEL, A.; CLARK, S.C.; DAVID, J.R. ; REMOLD, H.G. Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates intracellular killing of *Leishmania donovani* by human monocyte-derived macrophages. **J Exp Med**, 166:1436-1446, 1987.

WILLE, U.; VILLEGAS, E.N.; CRAIG, L.; PEACH, R.; HUNTER, C.A. Contribution of interleukin-12 (IL-12) and the CD28-B7 and CD40/CD40 ligand pathways to the development of a pathological T-cell response in IL-10-deficient mice. **Infect Immun**, 70:6940-6947, 2002.

YAMAUCHI, P.S.; BLEHARSKI, J.R.; UYEMURA, K.; KIM, J.; SIELING, P.A.; MILLER, A.; BRIGHTBILL, H.; SCHLIENGER, K.; REA, T.H.; MODLIN, R.L. A role for CD40-CD40 ligand interactions in the generation of type 1 cytokine responses in human leprosy. **J Immunol**, **165**:1506-1512, 2000.

YOSHIMOTO, T.; TAKEDA, K.; TANAKA, T.; OHKUSU, K.; KASHIWAMURA, S.; OKAMURA, H.; AKIRA, S.; NAKANISHI, K. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. **J Immunol**, **161**:3400-3407, 1998.

YU, C.; SUN, K.; TSAI, C.; TSAI, Y.; TSAI, S.; HUANG, D.; HAN, S.; YU, H. Expression of Th1/Th2 cytokine mRNA in peritoneal exudative polymorphonuclear neutrophils and their effects on mononuclear cell Th1/Th2 cytokine production in MRL-lpr/lpr mice. **Immunology**, **95**:480-487, 1998.

ZHOU, P.; SEDER, R.A. CD40 ligand is not essential for induction of type 1 cytokine responses or protective immunity after primary or secondary infection with *Histoplasma capsulatum*. **J Exp Med**, **187**:1315-1324, 1998.

Anexo 1- Termo de Compromisso

Título do Projeto: O Papel das Moléculas Co-estimulatórias na Imunomodulação da leishmaniose

Responsável: Dra Aldina Maria Prado BARRAL

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu _____, fui informado que este estudo tem por objetivo estudar as substâncias que entram na formação da lesão da leishmaniose cutânea. Foi explicado que esta pesquisa poderá não ter benefício direto para mim, mas poderá trazer informações importantes que vão ajudar no diagnóstico e tratamento de outras pessoas.

Neste estudo será necessário realizar exames que incluem: 1) retirada do material da íngua, utilizando agulhas e seringas descartáveis, podendo haver desconforto no local da picada da agulha; 2) coleta de um pequeno pedaço da lesão, que será feita com anestesia local, não provocando dor. 3) coleta de sangue também realizada com seringas e agulhas descartáveis. Estes exames também serão feitos para diagnosticar a doença e serão realizados por médicos experientes, não trazendo prejuízo para a minha saúde.

Também fui informado que terei acompanhamento médico, e que receberei o tratamento indicado com o remédio Glucantime®, que será feito com uma injeção por dia durante pelo menos 20 dias, podendo ser mais, a depender da evolução da doença.

Entendo que os resultados deste estudo serão publicados de forma científica, mas não será feita a identificação individual dos participantes. A minha participação é de minha própria vontade e sou livre para recusar participar ou me retirar em qualquer tempo, sem prejudicar os cuidados médicos que devo receber.

Recebi uma cópia deste documento e tive oportunidade de ler antes de decidir tomar parte. O médico encarregado explicou tudo e tirou as minhas dúvidas. Se eu

tiver outras perguntas sobre o estudo, poderei entrar em contato com Dra. Aldina Barral no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, LIP (Laboratório de Imunoparasitologia), ou pelo telefone (71) 356-8782, Ramal 259.

Pelo presente, dou meu consentimento em participar deste estudo.

<u>Assinatura do Paciente</u>	<u>Data</u>
<u>Assinatura do Pesquisador</u>	<u>Data</u>
<u>Assinatura da Testemunha</u>	<u>Data</u>

Anexo 2 –Bloqueio da via CD40-CD40L

Valores em pg/ml. Mediana (*) p<0,05

Citocina	SLA	SLA + anti-CD40L	p
TNF-α			
Total	239,3	120,6	0,3344
< 60 dias	232,5	163,5	0,4268
\geq 60 dias	386,4	102,3	0,3894
IL-10			
Total	62,48	38,06	0,4131
< 60 dias	68,02	45,19	0,8125
\geq 60 dias	64,61	19,03	0,2500
IFN γ			
Total	1986	1825	0,0842
< 60 dias	1546	1270	0,8203
\geq 60 dias	2180	2023	0,1189

Anexo 3 –Bloqueio da via CD28-B7

Valores em pg/ml. Mediana (*) p<0,05

Citocina	SLA	SLA + CTLA4 Ig	p
TNF- α			
Total	271,8	37	0,0003*
< 60 dias	231,2	27,9	0,0015*
\geq 60 dias	575	321,8	0,125
IL-10			
Total	75,24	9,11	0,0039*
< 60 dias	68,66	6,4	0,0313*
\geq 60 dias	44,2	34,85	0,2500
IFN- γ			
Total	1966	1262	0,0023*
< 60 dias	1738	874,2	0,0093*
\geq 60 dias	2061	1761	0,0625

Anexo 4 – Características clínicas dos pacientes - Jequié

Registro	Idade	Tempo de Lesão (dias)	Biópsia	Tempo de Cura (dias)	Linfadenopatia	Tamanho da Lesão (mm)	DTH
2486	35	120	-	evadiu	NSI	5	+
2490	35	60	-	evadiu	NSI	3	+
2499	43	150	NR	60	Não	3	+
2502	6	NSI	NR	60	NSI	2	+
2543	31	30	+	60	Sim	3	+
2548	43	20	NR	evadiu	Não	2	+
2550	29	90	-	60	Sim	5	+
2554	33	60	+	60	Sim	7	+
2556	31	15	+	20	Sim	1	+
2685	9	21	+	30	Sim	2	-
2694	12	30	NR	evadiu	Não	1	+
2774	49	21	+	150	Sim	8	+
2870	8	60	-	30	Sim	1	+
2871	17	60	+	30	Sim	2	NR
2872	5	90	-	90	Sim	2	+
2873	37	120	NR	60	Não	10	+
2874	8	15	-	60	Sim	3	+
2911	21	120	-	evadiu	Sim	3	+
3122	61	30	-	90	Não	3	NR
3162	18	45	+	60	Não	3	+

NR- Não realizado

NSI- Não soube informar

Evadiu- Não retornou ao ambulatório

Anexo 5- Características clínicas dos pacientes - Jiquiriçá

Registro	Idade	Tempo de Lesão	Biópsia	Tempo de Cura	Linfadenopatia	Tamanho da Lesão (mm)	DHT
4	7	30	-	60	sim	4	+
5	61	60	+	30	não	2	NR
6	11	30	-	90	sim	2	NR
8	12	20	-	evadiu	sim	3	+
9	50	60	-	evadiu	não	3	+
10	60	150	+	60	sim	1	+
11	58	45	-	60	sim	4	+
20	21	30	+	60	sim	5	+
21	17	60	-	180	não	-	+
24	10	30	-	180	sim	7	+
30	17	15	+	90	sim	1	NR
31	14	90	-	90	não	2	evadiu
33	8	30	+	evadiu	sim	3	+
35	22	60	+	-	não	1	evadiu
36	45	30	+	90	não	2	NR

NR- Não realizado

NSI- Não soube informar

Evadiu- Não retornou ao ambulatório