



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Saúde Pública



Luiza de Campos Reis

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE
CELULAR EM PORTADORES DE LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA ANTES E APÓS
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

RECIFE
2007

LUIZA DE CAMPOS REIS

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM
PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
ANTES E APÓS TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr^a Valéria Rego Alves Pereira

Recife, 2007

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

R375c Reis, Luiza de Campos.

Caracterização da resposta imune celular em portadores de leishmaniose tegumentar americana antes e após tratamento quimioterápico/ Luiza de Campos Reis. — Recife, 2007.

126 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu, Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2007.

Orientadora: Valéria Rêgo Alves Pereira.

1. Leishmaniose. 2. Leishmania braziliensis. 3. Citocinas. 4. Linfócitos T. 4 Quimioterapia. I. Pereira, Valéria Rêgo. II. Título.

CDU 616.993.161

LUIZA DE CAMPOS REIS

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ANTES E APÓS TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Dr^a Valéria Rêgo Alves Pereira (Orientadora)
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dr^a Sílvia Maria Lucena Montenegro (Revisor/ Titular Interna)
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dr^o José Cândido de Souza Ferraz Júnior (Titular Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Dr^a Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva (Suplente Interna)
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dr^a Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura (Suplente Externa)
Departamento de Patologia – UPE

AGRADECIMENTOS

Aos portadores de leishmaniose tegumentar americana que aceitaram participar deste estudo, sem os quais não seria possível sua realização.

A minha orientadora Dr^a Valéria Rego Alves Pereira pela sua orientação, apoio, dedicação no desenvolvimento deste trabalho, pelos ensinamentos e pela verdadeira amizade e cumplicidade.

A Maria Edileuza Felinto de Brito pelos ensinamentos, ajuda, incentivo, otimismo, dedicação e pela grande amizade.

A Marina Souza pelo convívio, amizade, ajuda e participação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, irmãos, minha vó e Maria pelo carinho e amor.

A Deus por toda a tranqüilidade e força em todos os momentos.

Ao Núcleo de Vigilância em Saúde e Ambiente do Município de Moreno principalmente a Cláudio, Edivaldo e Lucinha.

A Ângela Rapela Medeiros, médica dermatologista do grupo, pela assistência aos pacientes.

A Mineo Nakazawa e Wlademir Melo pelo apoio técnico sempre que foi preciso.

A todos os amigos conquistados do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM, em especial a Roberto Werkhauser, Edeneide Xavier, Eduardo Henrique e Cândido Ferraz por todo apoio e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade conquistada.

Aos meus amigos Éricka, Simone, Bruna, Júnior e Fernando pelo convívio diário,

ajuda e amizade sempre.

A todos do departamento de Imunologia do CPqAM, pela assistência sempre que foi preciso.

Ao Prof. Oscar Malta, por todas as oportunidades, pelo apoio, ajuda e confiança.

A todos os meus amigos do curso de mestrado, em especial a Andréa, Bruna, Filipe e Karina por todos os momentos durante esses dois anos. Pelo companheirismo, pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis e pelas horas de descontração. Além do auxílio na elaboração desta tese. Vocês foram fundamentais!

A Ana Lisa por todos os momentos bons compartilhados, por sempre estar perto, pelo apoio e otimismo nas horas de desânimos, pela ajuda na elaboração desta tese e pela nossa amizade. Obrigada mesmo!

Aos meus queridos amigos, pelo apoio sempre. Amo vocês!

Aos bibliotecários do CPqAM, em especial a Márcia, pelo auxílio em relação as referências bibliográficas.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) e a coordenação da Pós-Graduação do curso de Mestrado em Saúde Pública.

A CAPES, RENAMI e FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!!!

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença endêmica em Pernambuco (PE), onde a espécie circulante é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. As infecções por *Leishmania* apresentam uma resposta imune específica por parte do hospedeiro, dependente de células T, apresentando um perfil de citocinas Th1 e Th2. Neste estudo os objetivos foram avaliar a resposta linfoproliferativa e identificar a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 15 pacientes com LTA antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico com Glucantime® e de 10 indivíduos saudáveis (controle). Para avaliar a linfoproliferação foi utilizada timidina tritiada e para dosagem de citocinas, ELISA de captura. A resposta linfoproliferativa, bem como a produção de citocinas foram avaliadas frente a estímulos da fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis* (1,25 $\mu\text{g/ml}$), fitohemaglutinina (5 $\mu\text{g/ml}$) e concanavalina A (2,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 5 dias e 48 horas, respectivamente. Os resultados mostraram que todos os indivíduos apresentaram proliferação celular em resposta aos mitógenos, não havendo diferença significativa entre os grupos. Em relação ao antígeno, nenhum indivíduo do grupo controle apresentou linfoproliferação. Os pacientes apresentaram elevada resposta proliferativa antes e após tratamento, embora sem diferença estatística ao comparar esses dois momentos. A análise na produção das citocinas IFN- γ e IL-10 identificou diferença significativa ao comparar o grupo de pacientes em relação ao controle. Após tratamento quimioterápico, embora sem diferença estatística, a dosagem dos sobrenadantes dos pacientes revelou diminuição nos níveis de IFN- γ e aumento de IL-10. Estes resultados indicam que os pacientes produziram uma resposta celular específica a fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis*, sugerindo que mecanismos de regulação imunológica com a participação de células T de memória e células T regulatórias, além da dicotomia Th1 x Th2 estão presentes na evolução clínica desses indivíduos.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, resposta imune celular.

ABSTRACT

The American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is an endemic disease in Pernambuco (PE), where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is known as the unique causative agent. Infections by *Leishmania* show a specific T-cell-dependent immune response by the host, with a Th1 and Th2 cytokines profile. In this study the objective was to evaluate the lymphoproliferative response and to determine IFN- γ and IL-10 levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of fifteen patients with ACL prior and after twelve months of chemotherapy treatment with Glucantime® and ten non-infected donors (control group). To evaluate the lymphoproliferative response it was used tritiated thymidine and for cytokines dosage, the capture ELISA. Lymphoproliferation, such as cytokine production were evaluated through stimulus with soluble antigen from *L. (V.) braziliensis* (1,25 $\mu\text{g/ml}$), phytohemagglutinin (5 $\mu\text{g/ml}$) and concanavalin A (2,5 $\mu\text{g/ml}$) during five days and 48 hours, respectively. Results showed that all evaluated groups presented cellular proliferation in response to mitogens, without any significant difference between the groups. In relation to antigenic stimulus, no subject from the control group showed lymphoproliferation. The patients presented high lymphoproliferative response, although without statistical difference comparing these two moments. Analysis of IFN- γ and IL-10 cytokines production identified significant differences when comparing the patients with the control group. After chemotherapy treatment, although without statistical difference, the supernatants patient dosage revealed a decrease in the IFN- γ levels and an increase of IL-10. These results indicated that patients produced a specific cellular response to the *L. (V.) braziliensis* soluble antigen fraction, suggesting that immunomodulatory mechanisms with the participation of T memory cells and regulatory T cells, besides Th1 x Th2 dichotomy, are present in the clinical evolution of these patients.

Key-words: American tegumentary leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cellular immune response.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Formas promastigota e amastigota de <i>Leishmania</i>	17
Figura 2	Formas clínicas da LTA	19
Figura 3	A produção de citocinas pelos macrófagos, células dendríticas, células T e B determinam o desenvolvimento da infecção pela <i>Leishmania</i>	24
Figura 4	Gel de agarose (1%) das amostras de biópsias das lesões dos pacientes	45
Figura 5	Fotos representativas da cicatrização completa das lesões dos pacientes	46
Figura 6	<i>SDS-PAGE</i> de proteínas solúveis de <i>L. (V.) braziliensis</i>	47
Figura 7	Gráfico comparativo da resposta de PBMC dos pacientes de LTA e do grupo controle ao antígeno solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> em 3 dias de cultivo.	49
Figura 8	Gráfico comparativo da resposta de PBMC dos pacientes de LTA e do grupo controle ao antígeno solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> em 4 dias de cultivo.	50
Figura 9	Gráfico comparativo da resposta de PBMC dos pacientes de LTA e do grupo controle ao antígeno solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> em 5 dias de cultivo.	50
Figura 10	Gráfico comparativo da resposta de PBMC dos pacientes de LTA e do grupo controle ao antígeno solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> em 6 dias de cultivo.	51
Figura 11	Gráfico comparativo da resposta linfoproliferativa de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT) e após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle (Cts) estimulado com ConA (2,5 µg/ml).	53
Figura 12	Gráfico comparativo da resposta linfoproliferativa de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT) e após	54

- tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle (Cts) estimulado com PHA (5 µg/ml).
- Figura 13 Gráfico comparativo da resposta linfoproliferativa de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT) e após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle (Cts) ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (1,25 µg/ml). 53
- Figura 14 Gráficos da padronização da produção de IFN-γ durante 24h, 48h e 6 dias dos pacientes de LTA e do grupo controle frente as diferentes concentrações do antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. 57
- Figura 15 Gráficos da padronização da produção de IL-10 durante 24h, 48h e 6 dias dos pacientes de LTA e do grupo controle frente as diferentes concentrações do antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. 58
- Figura 16 Gráfico da quantificação da produção de IFN-γ (pg/ml) em sobrenadante de cultura de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT), após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle na presença dos mitógenos ConA, PHA e nas culturas sem estímulo. 60
- Figura 17 Gráfico da quantificação da produção de IFN-γ (pg/ml) em sobrenadante de cultura de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT), após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle na presença de 1,25 µg/ml do antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. 62
- Figura 18 Gráfico da quantificação da produção de IL-10 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT), após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle na presença dos mitógenos ConA, PHA e nas culturas sem estímulo. 64

Figura 19 Gráfico da quantificação da produção de IL-10 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT), após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle na presença de 1,25 µg/ml do antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*.

65

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Associação da espécie do parasito com as formas clínicas	20
Tabela 2	Características dos pacientes em relação a localidade de origem, sexo, faixa etária, forma clínica, número de lesões e tempo de evolução da doença	44
Tabela 3	Resultados laboratoriais dos pacientes	45
Tabela 4	Respostas de PBMC aos mitógenos ConA (2,5 µg/ml) e PHA (5 µg/ml) entre os pacientes (Pcs) e o grupo controle (Cts) durante 3, 4, 5 e 6 dias de cultivo.	48
Tabela 5	Estatísticas descritivas das respostas linfoproliferativas de PBMC ao mitógeno ConA (2,5 µg/ml) entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle.	53
Tabela 6	Estatísticas descritivas das respostas linfoproliferativas de PBMC ao mitógeno PHA (5 µg/ml) entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle.	54
Tabela 7	Estatísticas descritivas das respostas linfoproliferativas de PBMC ao antígeno solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> (1,25 µg/ml) entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle.	55
Tabela 8	Estatísticas descritivas da produção de IFN-γ em sobrenadante de cultura de PBMC aos mitógenos ConA (2,5 µg/ml), PHA (5 µg/ml) e culturas sem estímulo entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle.	60
Tabela 9	Estatísticas descritivas da produção de IFN-γ em sobrenadante de cultura de PBMC ao antígeno solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> (1,25 µg/ml) entre os pacientes	62

antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle.

- | | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 10 | Estatísticas descritivas da produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC aos mitógenos ConA (2,5 µg/ml), PHA (5 µg/ml) e culturas sem estímulos entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle. | 64 |
| Tabela 11 | Estatísticas descritivas da produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC ao antígeno solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> (1,25 µg/ml) entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle. | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[³ H]TdR	Timidina tritiada
(V.)	<i>Viannia</i>
ABTS	2,2'-azino-di[sulfato (6) de 3-etil benzitiazolina]
AgSol	Antígeno solúvel de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BSA	Albumina sérica bovina
ConA	Concanavalina A
CPM	Contagem por minuto
Cts	Controles
DAT	Teste de aglutinação direta
DNA	Acido desoxiribonucléico
DOs	Densidades ópticas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IE	Índice de estimulação
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
mRNA	RNA mensageiro
NK	Células <i>natural-killer</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
Pcs	Pacientes
PHA	Fitohemaglutinina

RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SBF	Soro bovino fetal
SbV	Antimoniais pentavalentes
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T CD ₄ ⁺	Linfócito T CD ₄ ⁺
T CD ₈ ⁺	Linfócito T CD ₈ ⁺
T.A.	Temperatura ambiente
T _{CM}	Célula T de memória central
T _{EM}	Célula T de memória efetora
TEMED	Tetrametil-etilenodiamino
TGF-β	Fator beta de crescimento e transformação
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF-β	Fator de necrose tumoral beta
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)
μCi	micro-Curie

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos Gerais	16
1.2 Formas clínicas	19
1.3 Diagnóstico	22
1.4 Resposta imune	24
1.5 Tratamento	29
2 JUSTIFICATIVA	32
3 PERGUNTA CONDUTORA	33
4 OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo geral	34
4.2 Objetivos específicos	34
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	35
5.1 Tipo de estudo	35
5.2 Descrição da população de estudo	35
5.2.1 Considerações éticas	36
5.2.2 Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes	36
5.3 Obtenção de antígenos solúveis de <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i>	38
5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	38
5.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico dos pacientes selecionados	39
5.6 Ensaio de proliferação celular	40
5.7 Obtenção de sobrenadante de cultura para identificação das citocinas	41
5.8 Dosagem de citocinas secretadas nos sobrenadantes de cultura	41
5.9 Análise estatística	42
6 RESULTADOS	43
6.1 Caracterização da população de estudo	43
6.2 Perfil eletroforético do antígeno solúvel de <i>L. (V.)</i>	47

<i>braziliensis</i>	
6.3 Ensaio de proliferação celular	48
6.3.1 Padronização da proliferação celular	48
6.3.2 Proliferação celular antes e após tratamento quimioterápico	52
6.4 Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura	56
6.4.1 Padronização do ensaio de sobrenadante de cultura	56
6.4.2 Avaliação da produção de IFN- γ antes e após tratamento	59
6.4.3 Avaliação da produção de IL-10 antes e após tratamento	63
7 DISCUSSÃO	66
8 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- paciente	94
APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – grupo controle	95
APÊNDICE C – Artigo publicado	96
APÊNDICE D – Artigo em preparação	109
ANEXO A - Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose tegumentar americana: Aspectos Gerais

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença antroponótica, causada por protozoários digenéticos pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, de transmissão vetorial, acometendo pele, mucosas e cartilagens. É uma doença em expansão, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, seis espécies estão associadas à doença no homem, sendo uma representante do subgênero *Leishmania* e cinco pertencentes ao subgênero *Viannia*. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie responsável pela LTA no país (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARZOCHI, 1992; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

A incidência da doença no Brasil tem aumentado consideravelmente. Cerca de 21000 casos foram notificados em 1998, com o aumento da ocorrência para 40000 em 2002. Em média, apresenta uma incidência de 35000 casos/ano e é distribuída do sul da Bacia Amazônica ao sudeste do país (DESJEUX, 2004; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). A LTA incide em todas as regiões do Estado de Pernambuco, destacando-se a região da Zona da Mata com mais de 60% do total dos casos registrados (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999). Entre 1990 e 2000 foram notificados 3268 casos no Estado e em 2004 foram registrados 733 casos. Esse fato representa um sério problema de saúde pública (SNVS/PE, 2006). Os fatores que contribuem para a instalação da doença não se referem somente às migrações maciças, urbanizações e desmatamentos, mas também fatores de riscos individuais como co-infecção com HIV (ASHFORD, 2000).

Durante o seu ciclo de vida, a *Leishmania* apresenta as formas promastigota e amastigota (Figura 1). A forma promastigota caracteriza-se por ser flagelada, móvel e alongada, desenvolvendo-se no tubo digestivo de flebotomos. A amastigota é a forma intracelular obrigatória dos vertebrados, imóvel, ovalada ou arredondada. Ambas as formas podem ser mantidas em culturas axênicas (BALANCO *et al.*, 1998; HOARE; WALLACE, 1966).



Figura 1: Formas promastigota e amastigota da *Leishmania*.

(Fonte: GONTIJO; CARVALHO, 2003)

O gênero *Leishmania* é dividido em dois sub-gêneros: sub-gênero *Leishmania*, que incluem espécies do complexo *mexicana* onde as formas promastigotas multiplicam-se nas regiões média e anterior do intestino do flebótomo; e sub-gênero *Viannia*, que incluem espécies do complexo *braziliensis* onde as formas promastigotas migram para as regiões anterior, média e posterior do intestino, colonizando o vetor (LAINSON; SHAW, 1998).

A transmissão ocorre quando as fêmeas de dípteros, pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, realizam o repasto sanguíneo e inoculam promastigotas metacíclicas, forma infectante. Esta forma possui características biológicas específicas que a diferenciam da forma amastigota e da promastigota, como a falta da capacidade de replicação. Estas formas penetram nas células do sistema fagocitário mononuclear, transformando-se em amastigotas, que se multiplicam intensamente, promovendo o rompimento de células macrófagas, podendo ser fagocitadas por outras células. O inseto, ao picar o hospedeiro parasitado, ingere macrófagos parasitados por amastigotas. Em seguida, amastigotas presentes no intestino médio do inseto se transformam em promastigotas. Estas se multiplicam por divisão binária, alcançam o aparelho bucal e são inoculadas no hospedeiro durante repasto sanguíneo (AKOPYANTS *et al.*, 2004; REY, 2001).

Os reservatórios variam conforme a espécie de *Leishmania* incluindo espécies silvestres, como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), marsupiais (*Didelphis marsupialis*) e roedores; além de animais domésticos como o cão, eqüinos e mulas. Em Pernambuco foram isoladas amostras de *L. (V.) braziliensis* em *Bolomys lasiurus*, *Rattus rattus* e *Nectomys squamipes*,

mamíferos silvestres, constituindo a primeira incriminação categórica de hospedeiros reservatórios de *L. (V.) braziliensis* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003).

1.2 Formas clínicas

As formas clínicas da LTA dependem da espécie do parasito, destacando-se sua virulência e tropismo, da quantidade inoculada, do vetor, além das características epidemiológicas, constituição genética e condição imunológica do hospedeiro (ROGERS *et al.*, 2002). A infecção humana pode ser assintomática ou pode apresentar um espectro de manifestações clínicas que variam desde lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou difusas ou até graves lesões mucocutâneas (GRIMALDI; TESH, 1993) (Figura 2).

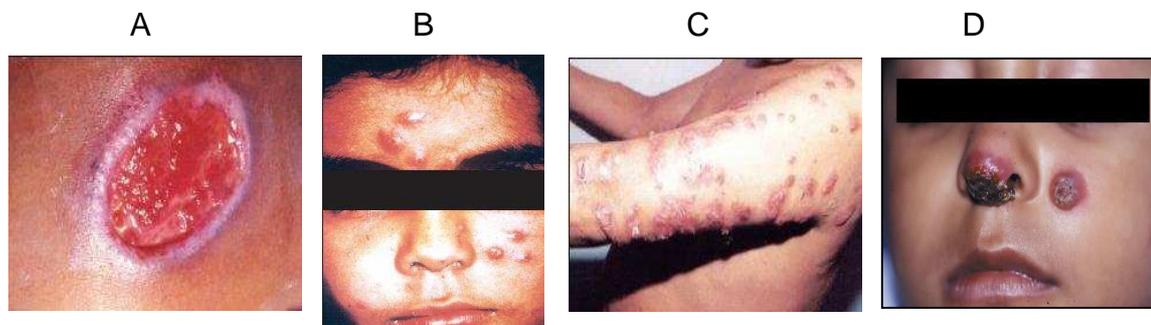


Figura 2: Formas clínicas da LTA. A) forma cutânea localizada; B) forma cutânea disseminada; C) forma cutânea difusa; D) forma mucocutânea. FONTE: FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE.

As manifestações clínicas estão geralmente associadas com uma espécie de *Leishmania*. No entanto, algumas espécies podem causar mais de uma forma clínica (GARCIA *et al.*, 2005). As seis espécies encontradas no Brasil são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, responsável pela leishmaniose cutânea localizada, disseminada e mucocutânea; *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) naiffi*, responsáveis pela leishmaniose cutânea localizada; e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsável pela leishmaniose cutânea localizada e cutânea-difusa (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; LAINSON; SHAW, 1987) (Tabela 1). Em Pernambuco, até o momento, a única espécie circulante é a *L. (V.) braziliensis* (ANDRADE *et al.*, 2005; BRANDÃO-FILHO, 2001; BRITO *et al.*, 1993).

Tabela 1: Associação da espécie do parasito com as formas clínicas.

Espécie de <i>Leishmania</i>	Formas Clínicas			Mucocutânea
	Cutânea			
	Localizada	Disseminada	Difusa	
<i>L. (L.) amazonensis</i>	X		X	
<i>L. (V.) guyanensis</i>	X			
<i>L. (V.) shawi</i>	X			
<i>L. (V.) naiffi</i>	X			
<i>L. (V.) lainson</i>	X			
<i>L. (V.) braziliensis</i>	X	X		X

L. (L.)= *Leishmania (Leishmania)*; *L. (V.)*= *Leishmania (Viannia)*.

A leishmaniose cutânea consiste em lesões encontradas exclusivamente na pele, iniciando-se no local em que as formas promastigotas infectantes são inoculadas. Pode ocorrer nas formas localizada, caracterizada por lesão única; disseminada, quando apresenta numerosas lesões em várias regiões do corpo em virtude de múltiplas picadas de insetos ou disseminação hematogênica; e na forma cutânea-difusa. Na maioria dos casos, observa-se uma doença com lesão ulcerada única (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARZOCHI, 1992).

As lesões cutâneas caracterizam-se por úlceras rasas com bordas elevadas em moldura, fundo granulomatoso, com ou sem exsudato e, em geral, são indolores. Também podem ser observados outros tipos de lesões como úlcero-crostoso, impetigóide, úlcero-vegetante, verrucosa ou tuberosa. Predominantemente, aparecem nas áreas corpóreas descobertas e tempo de incubação entre quinze dias a vários anos se manifestam. Apresentam poucos parasitos, tendência para cura espontânea ou uma boa resposta ao tratamento (DA-CRUZ *et al.*, 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARSDEN, 1986).

A forma cutânea-difusa é caracterizada por lesões nodulares ou papulosas sobre toda região do corpo, são graves e deformantes, ricas em parasitos. É uma enfermidade crônica, altamente resistente à quimioterapia, não existindo cura. É comum ocorrer em indivíduos com deficiência imunológica e está associada a *L. (L.) amazonensis* (BONFIM *et al.*, 1996; CÁCERES-DITTMAR *et al.*, 1993).

A leishmaniose mucocutânea é a forma mais agressiva e mutilante, caracterizada por infiltração, ulceração e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe e/ou laringe. É, na maioria das vezes, secundária as lesões cutâneas, surgindo por disseminação hematogênica meses ou anos após a resolução das

lesões de pele. O risco de deformidades permanentes é considerável e o diagnóstico precoce é essencial para a eficácia terapêutica e para evitar seqüelas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; MARSDEN, 1986; MARZOCHI, 1992).

A leishmaniose cutânea no Velho Mundo, causada principalmente pela *L. major* é uma doença benigna com o desenvolvimento de uma lesão cutânea localizada que tende para cura espontânea. Em contraste, a LTA causada pela *L. (V.) braziliensis* é uma doença crônica, com tendência para ocorrência de metástases. Além disso, 1 a 5% dos indivíduos infectados têm risco de desenvolverem a forma mucocutânea, devido à habilidade dos parasitos persistirem nas lesões cicatrizadas após a cura clínica (MENDONÇA *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que o processo infeccioso depende de fatores relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro. A sobrevivência de patógenos tais como a *Leishmania*, depende principalmente da evasão deste parasito ao sistema imune do hospedeiro (SACKS; SHER, 2002; ZAMBRANO-VILLA *et al.*, 2002).

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da LTA demonstra dificuldades pelo fato de suas manifestações clínicas se assemelharem a lesões ulceradas ou não de outras doenças como a hanseníase virchowiana, paracoccidiodomicose, úlcera tropical, sífilis, tuberculose cutânea, entre outras (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Além disso, existem as limitações dos métodos de diagnósticos convencionais. Portanto, o diagnóstico é realizado pela associação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e testes laboratoriais. Estes incluem a identificação de amastigotas pelas técnicas imunocitoquímicas em tecido, em “imprints” (impressão por aposição da biópsia), em aspirado de lesão e em avaliação histopatológica; identificação de promastigotas em culturas *in vitro*; métodos sorológicos como a imunofluorescência indireta (IFI), teste de aglutinação direta (DAT), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) e Western-blot, baseados na presença de anticorpos específicos contra antígenos parasitários; imunidade mediada por células como a intradermorreação de Montenegro (IDRM) (teste de hipersensibilidade tardia) e detecção de DNA do cinetoplasto através da reação em cadeia de polimerase (PCR) (KAR, 1995).

Um dos testes diagnósticos mais comuns, a identificação direta de amastigotas ao microscópio óptico pela técnica de Giemsa, apresenta uma sensibilidade entre 50-70%. Essa técnica depende do número de parasitos presentes na lâmina. A positividade do teste é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano. Como todas as espécies de *Leishmania* são morfológicamente idênticas, essa técnica não é capaz de determinar a espécie do parasito (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; VEGA-LÓPEZ, 2003).

A cultura de promastigotas para o isolamento do parasito, a partir de material obtido por punção aspirativa ou biópsia das lesões dos pacientes, é uma técnica altamente específica para o diagnóstico, porém apresenta baixa sensibilidade. É difícil manter o parasito *in vitro* devido a constante contaminação e a variação na eficácia dos meios de cultura, além do longo período necessário para isolar o parasito na cultura. Essa técnica permite determinar a espécie do parasito através de anticorpos monoclonais, isoenzimas e PCR (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2006).

A IDRM é um teste de hipersensibilidade tardia que apresenta uma alta sensibilidade e uma especificidade que varia de acordo com o antígeno utilizado. Embora apresente resultado positivo na maioria dos casos de LTA (90%), o resultado é negativo em lesões recentes, na forma cutânea difusa e em pacientes imunodeprimidos. Em áreas endêmicas, é comum o teste ser positivo devido a ocorrência de infecções subclínicas (VEGA-LÓPEZ, 2003).

Os testes sorológicos, como a IFI, o ELISA e o Western Blot, apresentam limitações como: não correlacionam os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença e podem apresentar reações cruzadas com outros tripanosomatídeos. Pelas limitações dessas técnicas, abordagens imunológicas alternativas vêm sendo empregadas. Uma delas é a citometria de fluxo que permite detectar anticorpos anti-*Leishmania* (ROCHA *et al.*, 2002; 2006).

Outra metodologia empregada é a PCR. Embora demonstre alta sensibilidade e especificidade, sua aplicação é inviável para estudo populacional em virtude do alto custo. Atualmente, não existe um teste padrão-ouro para LTA e, muitas vezes, a combinação de diferentes técnicas diagnósticas é necessária para obter resultados mais precisos (BRITO *et al.*, 2000; 2001; KAR, 1995).

completamente esclarecido o papel de anticorpos específicos na imunidade contra a *Leishmania* (SOUZA *et al.*, 2005; TRUJILLO *et al.*, 1999).

A infecção experimental em camundongos tem sido utilizada para examinar aspectos da relação parasito-hospedeiro. Estudos em camundongos infectados com *L. major*, modelo melhor estudado na doença infecciosa crônica, têm mostrado que a resposta imune mediada por células T desempenha um papel importante no processo para cura ou agravamento da doença (SCHARTON; SCOTT, 1993; SCOTT; FARREL, 1998).

Muitas linhagens de camundongos resistentes, como C57BL/6, CBA, C3H, desenvolvem uma doença auto-limitada quando infectadas com *L. major* ou *L. tropica*. Apresentam um aumento na produção de IL-12 que ativa células NK e células T CD4⁺ e CD8⁺ a produzirem IFN- γ , necessário para o desenvolvimento da resposta Th1 (HOWARD *et al.*, 1980; ROGERS *et al.*, 2002).

Linhagens susceptíveis, como BALB/c, apresentam uma doença progressiva e severa, com um aumento na expressão de mRNA para IL-4 e na produção de IL-5, IL-10 e IL-13 (HIMMELRICH *et al.*, 2000; HOWARD *et al.*, 1980; SCOTT; FARREL, 1998). IL-4 diminui a regulação da expressão da subunidade β dos receptores da IL-12 nas células Th1, suprimindo a produção de IFN- γ , levando ao desenvolvimento da resposta Th2 (CARRERA *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1994). A IL-10 desempenha um papel fundamental na inibição da ativação macrofágica e contribui para o crescimento do parasito nas lesões, uma vez que camundongos BALB/c IL10^{-/-} mostraram-se capazes de controlar a progressão da doença durante infecção por *L. major* (KANE; MOSSER, 2001).

Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* não é tão bem caracterizada como a resposta em camundongos, em virtude de sua complexidade (REIS *et al.*, 2006). Em todas as formas clínicas da LTA, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, aceita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção também está relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2 (BACELLAR *et al.*, 2002; PIRMEZ *et al.*, 1993).

O evento crucial para indução da resposta imune curativa contra a *Leishmania* é a eficiente ativação de células capazes de produzir citocinas protetoras. As citocinas levam à ativação de macrófagos via IFN- γ , resultando na

síntese de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio e, conseqüentemente, à morte dos parasitos intracelulares (SALAIZO-SUAZO *et al.*, 1999).

Na forma cutânea localizada, há uma forte resposta de células T, com citocinas do tipo Th1, como IFN- γ e IL-12, e uma alta freqüência de células B (LOUZIR *et al.*, 1998; VIEIRA *et al.*, 2002). Na leishmaniose cutânea disseminada, as respostas imunológicas são bem variadas. Tanto há uma forte resposta de células T como uma diminuição de imunidade celular. Os níveis de células T CD4⁺ são baixos e os títulos de anticorpos são elevados (CARVALHO *et al.*, 1994).

Indivíduos com a forma cutânea-difusa falham em produzir uma resposta imune mediada por células durante a infecção, sendo incapazes de controlar a multiplicação parasitária e a progressão da doença, devido a falta da expressão de mRNA para IFN- γ e baixa expressão para IL-2. Apresentam elevados títulos de anticorpos específicos contra *Leishmania*, exibindo uma resposta quase exclusivamente do tipo Th2, com elevados níveis de IL-4 (BOMFIM *et al.*, 1996; CÁCERES-DITTMAR *et al.*, 1993; TRUJILLO *et al.*, 1999).

A leishmaniose mucocutânea apresenta uma elevada resposta por células T específicas, tanto Th1 como Th2, sendo direcionada para uma resposta do tipo Th1. Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ são produzidas, além de IL-4. Essa resposta é fracamente regulada por IL-10 e TGF- β , mostrando que uma resposta inadequada do tipo Th1, considerada protetora na maioria das formas dessa doença, pode levar a uma imunopatogênese exacerbada. Altos níveis de anticorpos também são encontrados (AMATO *et al.*, 2003; BACELLAR *et al.*, 2002; JUNQUEIRA PEDRAS *et al.*, 2003).

A resposta imune mediada por células T na infecção por *L. (V.) braziliensis*, comparada a *L. major*, tem sido menos estudada devido alguns fatores. Há dificuldade no crescimento *in vitro* deste parasito, ineficiente conversão em promastigotas metacíclicos, além da resistência de muitas linhagens de camundongos frente a infecção, devido a inabilidade dessa espécie de *Leishmania* de inibir a resposta Th1 (LIMA *et al.*, 1999).

Recentemente, Moura *et al.* (2005) estabeleceram um modelo experimental para *L. (V.) braziliensis* utilizando camundongos BALB/c. O trabalho teve como resultado o desenvolvimento clínico similar ao observado no homem, com a

presença de lesões ulceradas, persistência parasitária e resposta imune celular específica. A dificuldade no estabelecimento do modelo experimental para *L. (V.) braziliensis* contribuiu e contribui para o surgimento de estudos com pacientes (CARVALHO *et al.*, 1995; COUTINHO *et al.*, 1996; DA-CRUZ *et al.*, 2002; FARIA *et al.*, 2005; LEOPOLDO *et al.*, 2006; TELINO *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2001).

Paralelamente à existência de uma resposta imunológica por parte do hospedeiro, a sobrevivência e a persistência parasitária dependem de estratégias de escape da resposta imune inata e adaptativa (REIS *et al.*, 2006).

O primeiro mecanismo de escape dos promastigotas é evitar a lise direta através do sistema Complemento, tendo a participação de glicoproteínas e açúcares da membrana do parasito, o LPG e a metaloproteinase gp63. Estes atuam por fosforilação inativando componentes do sistema Complemento como o C3, C5 e C9, com a subsequente inibição das vias clássica e alternativa do Complemento; e impedem o acesso do complexo de ataque à membrana (C5b-C9). A gp63 protege o parasito através da acelerada conversão proteolítica na superfície do parasito do C3b para C3bi que funciona como uma opsonina, facilitando a ligação com receptores do Complemento tipo 3 (CR3) nos macrófagos (BOGDAN *et al.*, 1996; BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998).

Ao escaparem do meio extracelular, os parasitos irão penetrar nas células fagocíticas através da interação com os receptores dos macrófagos e com as moléculas da superfície do parasito (SACKS; SHER, 2002). Essa ligação pode ser direta, via parasito-macrófono, ou indireta, através de moléculas do soro associadas com moléculas do parasito e assim com os macrófagos. Geralmente os promastigotas são opsonizados pelos C3b e C3bi, que se fixam respectivamente nos CR1 e CR3 do macrófono.

Portanto, para o estabelecimento da infecção, a *Leishmania* precisa sobreviver ao processo de fagocitose que envolve a invasão em células-alvo seguras, a inibição da formação do fagolisossomo e a remoção dos radicais hidroxilas e ânions superóxidos através do LPG, a inibição da degradação das enzimas do fagolisossomo pela gp63, a transformação em amastigotas que são mais resistentes as enzimas óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ao pH ácido do fagolisossomo. A *Leishmania* utiliza outros mecanismos que auxiliam nas estratégias de escape da defesa do hospedeiro. A modulação de citocinas pode

ocorrer através da inibição/desativação de macrófagos, pela supressão ou perda da indução da ativação de citocinas; a inibição da apresentação de antígeno e da estimulação de células T, pela supressão, internalização e degradação de moléculas MHC II e a alteração da função/diferenciação de células T através da indução e expansão de células do tipo Th2 são algumas das estratégias de escape do parasito à resposta do hospedeiro (BOGDAN *et al.*, 1996; BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; ROGERS *et al.*, 2002).

Esses mecanismos imunológicos promovem a persistência do parasito após a cura clínica da doença. A demonstração da persistência em indivíduos curados clinicamente levanta várias questões a respeito da evolução clínica, da epidemiologia e das estratégias para o controle da leishmaniose (AEBISCHER, 1994; MENDONÇA *et al.*, 2004).

1.5 Tratamento

O tratamento é baseado em quimioterapia, sobretudo com antimoniais pentavalentes (SbV), como o antimoniato de meglumine ou antimoniato de N-metilglucamine (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®). Ambos apresentam alta toxicidade e inúmeros efeitos colaterais. A droga de primeira escolha e a única disponível no Brasil é o Glucantime®, com o esquema terapêutico composto por doses de 20 mg/Kg/dia através de injeções intramusculares em ciclos de vinte a trinta dias. O índice de sucesso após um primeiro ciclo de antimoniato de meglumine varia de 26% a 100% (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2006).

Apesar dos antimoniais serem as principais drogas contra a *Leishmania*, usados há mais de 50 anos, ainda não se sabe corretamente o mecanismo de ação destas drogas. Para agir contra o parasito é necessário que o antimonial pentavalente entre no fagolisossomo do hospedeiro e seja reduzido à sua forma trivalente ou forma ativa. Essa redução pode ocorrer no contato com o parasito, no macrófago ou em ambos. O mecanismo e o local dessa redução ainda não está completamente esclarecido (OUELLETTE, 2001).

Quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade do seu uso, a anfotericina B e o isotionato de pentamidina são as drogas de segunda escolha. A anfotericina B é administrada por via endovenosa, gota a gota, na dose diária de 0,2 mg/Kg/dia até no máximo 50mg. É dissolvida em soro glicosado 5% com tempo de infusão de 3 a 4 horas. Já o isotionato de pentamidina é usada na dose de 4 mg/Kg/dia, por via intramuscular, sendo aplicado a cada dois dias (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

O critério de cura é baseado na cura clínica pela completa cicatrização da lesão. Há acompanhamento do paciente durante pelo menos um ano após o término do tratamento, sem a ocorrência de reativação da lesão (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

A eficácia do tratamento é um fenômeno complexo que envolve fatores do hospedeiro, como a resposta imunológica, características genéticas do paciente e a forma clínica da doença; vantagens do tratamento, pela qualidade da droga, duração

da terapia e efeitos colaterais; e até mesmo pelas características do parasito, como a espécie e resistência a drogas, que tem aumentado com o uso de antimoniais pentavalentes (ARMIJOS *et al.*, 2004; YARDLEY *et al.*, 2006).

A busca de terapias alternativas e de imunoprolifáticos têm sido recomendado como prioridade para as estratégias de controle da doença (ARMIJOS *et al.*, 2004). Desde a década de 80, estudos visando obter uma conduta terapêutica alternativa para LTA têm sido realizados utilizando vacinas com associação ou não a outros fármacos (MAYRINK *et al.*, 1979; 1992; 2006). MACHADO-PINTO *et al.* (2002) associaram o antimônio com uma vacina de promastigotas mortas de *L. amazonensis* e observaram que essa imunoterapia foi altamente eficaz no tratamento da LTA. Vacinas utilizando preparações antigênicas de várias espécies de *Leishmania*, com ou sem BCG como adjuvante, têm sido testadas para a forma cutânea (COLER; REED, 2005). Moléculas imunogênicas presentes na saliva de flebótomos também podem atuar como adjuvantes (GILLESPIE *et al.*, 2000; KAMHAWI, 2000).

Esses resultados mostram que o mecanismo imune envolvido no processo de cura pode ser provavelmente diferente em cada tipo de tratamento. Segundo Coler e Reed (2005), a quimioterapia associada à resistência a drogas e a toxicidade enfatizam a necessidade de uma vacina eficaz contra a leishmaniose que induza uma correta resposta imune, como uma resposta Th1.

Para isso é necessário estudos de novos antígenos potencialmente candidatos a vacinas contra leishmaniose. Muitas proteínas do parasito parecem induzir uma resposta de células T benéfica ao homem e também conferir proteção contra infecção em modelo experimental. Essas proteínas incluem a glicoproteína 63 (gp63), lipofosfoglicano (LPG) associado a proteínas, dp72, P-4, P-8, LACK, PH8, que são candidatos potenciais para vacinas (COLER; REED, 2005; HABERER *et al.*, 1998).

As mais investigadas são a gp63 e o LPG, presentes abundantemente na superfície do parasito. Esses antígenos induziram uma eficiente proteção em modelo experimental (HABERER *et al.*, 1998).

A proteína P-4 purificada de amastigotas de *Leishmania pifanoi* demonstrou uma resposta celular do tipo Th1 em PBMC de indivíduos infectados por *L. (V.) braziliensis* (HABERER *et al.*, 1998). O antígeno PH8, derivado de promastigotas de

L. amazonensis, em estudos com camundongos levou à produção de níveis elevados de IFN- γ e ausência de IL-4 (MAYRINK *et al.*, 2002).

Além dessas proteínas, extratos brutos, solúveis e insolúveis de promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* têm sido utilizados para avaliação *in vitro* da resposta imune na tentativa de contribuir para a identificação de novas moléculas imunogênicas do parasito (ANTONELLI *et al.*, 2004; DA-CRUZ *et al.*, 1994; 2002; TELINO *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2001).

Estudos utilizando extratos brutos de *L. major*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* nas formas solúveis e insolúveis, demonstraram uma elevada produção de IFN- γ , TNF- α e níveis similares de IL-10 nos pacientes quando comparado com indivíduos sadios (KEMP *et al.*, 1999; TELINO *et al.*, 2005).

Para uma vacina ideal, todos esses antígenos citados preferencialmente devem estar conservados nas diferentes espécies de *Leishmania*, expressos abundantemente na superfície do parasito e induzirem uma resposta imune celular adequada (COLER; REED, 2005; HABERER *et al.*, 1998).

2 JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores realizados por Brito *et al.* (2001) através de ensaios de ELISA, IFI e Western blot, utilizando-se frações antigênicas solúveis de *L. (V.) braziliensis*, observaram uma diminuição na reatividade anticórpica quando se comparou soros de pacientes com LTA ativa e após tratamento específico. Inclusive, resultado similar foi observado em indivíduos com cura espontânea, sugerindo que esses antígenos podem ser usados como marcadores de cura. Frente a esses resultados e para melhor compreender os aspectos imunológicos da LTA em nossa região, faz-se necessário avaliar a resposta linfoproliferativa e o envolvimento das citocinas dos pacientes com LTA, antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico, pela estimulação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com essa fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis*.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Qual é o perfil da resposta imune celular em pacientes com LTA ativa, antes e após tratamento quimioterápico, utilizando-se a fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis*?

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Determinar o perfil da resposta imune celular em PBMC de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana ativa antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico utilizando-se a fração antigênica solúvel de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

4.2 Específicos

- Caracterizar a população de estudo quanto aos aspectos clínicos e laboratoriais;
- Determinar a concentração antigênica e o tempo de cultivo para os ensaios de proliferação celular e ensaios de sobrenadante de cultura para detecção das citocinas;
- Avaliar a resposta específica de proliferação celular de PBMC antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico;
- Identificar a produção das citocinas interferon-gama (IFN- γ) e interleucina 10 (IL-10) nos sobrenadantes de cultura de PBMC antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 Tipo de estudo

O estudo foi do tipo experimental ou ensaio clínico não-randomizado. Este ensaio consiste na comparação entre um grupo de participantes sujeitos à intervenção e outro formado por sujeitos não-expostos à intervenção, denominado controle. Ambos escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

5.2 Descrição da população de estudo

Os pacientes do presente estudo foram procedentes dos municípios de Moreno, Aldeia, Amaraji e Vitória de Santo Antão, localizados nas regiões de Zona da Mata, áreas endêmicas para LTA em Pernambuco. Foram selecionados quinze pacientes, de ambos os sexos, de acordo com os seguintes critérios de inclusão: idade superior a 12 anos, portadores de lesões cutâneas e/ou mucocutâneas ativas, diagnóstico confirmado e ausência de tratamento quimioterápico prévio. Como critérios de exclusão foram adotados os seguintes: idade abaixo de 12 anos, histórico de LTA pregressa, ter feito uso de tratamento quimioterápico e ter recusado assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os pacientes receberam atendimento médico no ambulatório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, onde foram realizados os exames laboratoriais (item 5.2.2) e os procedimentos para coleta de sangue antes do tratamento quimioterápico e 12 meses após o término do tratamento, confirmando a cura clínica. O critério de cura foi baseado na presença de cicatrização da lesão e na resposta terapêutica. Após tratamento quimioterápico, cada paciente foi monitorado afim de verificar o processo de cicatrização e a ocorrência de reações adversas durante a administração do tratamento.

O tratamento quimioterápico foi realizado nos postos de saúde dos municípios deste estudo, utilizando-se o Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina), droga

de primeira escolha, administrado via intramuscular. O tratamento foi feito em ciclo de 20 a 30 dias em doses diárias de 20 mg/Kg com intervalo de 10 dias entre cada série. Os pacientes foram submetidos a nova série do tratamento de acordo com o processo de cicatrização de cada indivíduo.

O grupo controle (n = 10) foi constituído por indivíduos saudáveis, residentes em área não endêmica, acima de 15 anos de idade e não ter recebido transfusão sanguínea.

O material coletado foi processado no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/FIOCRUZ, na cidade de Recife-PE.

5.2.1 Considerações éticas

Os procedimentos só foram realizados após todos os participantes terem concordado em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndices 1 e 2) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ (Anexo 1).

5.2.2 Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes

Os pacientes foram submetidos a avaliação clínica, epidemiológica e a alguns procedimentos laboratoriais para confirmação da doença. Os exames laboratoriais incluíram:

a) Intradermorreação de Montenegro (IDRM): teste de hipersensibilidade tardia, realizado através da inoculação intradérmica na face anterior do antebraço de 0,1 ml do antígeno de *Leishmania amazonensis* (leishmanina) produzido por Biomanguinhos/FIOCRUZ. A leitura foi realizada após 48 ou 72 horas, sendo considerado positivo a enduração igual ou maior que 5 mm.

b) Pesquisa direta, realizada com material obtido através da escarificação da borda da lesão, utilizando lâmina de bisturi estéril. Em seguida, os esfregaços foram feitos em lâminas, fixados com metanol e corados pelo Giemsa para identificação de amastigotas através da microscopia óptica;

c) Punção aspirativa realizada com seringa descartável contendo 0,3 ml de solução salina estéril, aplicada na borda da lesão e posterior aspirado do conteúdo para inoculação intraperitoneal em hamster (*Mesocricetus auratus*). Após três meses, estes animais foram sacrificados para retirada do baço, na tentativa de isolamento do parasito em meio de cultura NNN/Schneider;

d) Biópsia executada com “punch” medindo 4-6 mm de diâmetro. Parte dos fragmentos retirados da borda da lesão ativa foi destinada para a tentativa de isolamento do parasito em meio de cultura NNN/Schneider e para a realização da PCR;

e) Imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos circulantes específicos para *Leishmania* foi realizada através do Kit IFI-Leishmaniose humana produzido por Biomanguinhos/FIOCRUZ. O protocolo utilizado foi de acordo com as instruções do fabricante, sendo considerado como soros reagentes, a fluorescência do parasito na diluição 1:40.

f) Para a PCR em biópsias de lesão ativa foi utilizado o kit “GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation” (Amersham Biosciences), segundo protocolo do fabricante, para extração do DNA. O DNA obtido foi submetido a amplificação em um termociclador automático (Modelo Px2, Thermo Electron Corporation), utilizando os primers 5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3' e 5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3' (DE BRUIJN; BARKER, 1992). A PCR foi realizada em um volume final de 25 µl contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, gelatina 0,1 mg/ml, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 25 pmoles de cada um dos primers, 2,5 U de Taq DNA Polimerase e 2 µl da amostra. A amplificação consistiu de 35 ciclos: 94°C (1min), 65°C (1min) e 72°C (1min), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C. Os produtos da PCR (10µl) foram analisados através da eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM) corados pelo brometo de etídeo, visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta afim de identificar o alvo de 750pb específico do sub-gênero *Viannia* de 750 pb (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

g) A caracterização da espécie de *Leishmania* pelo isolamento do parasito *in vitro* foi feita através da técnica de anticorpo monoclonal, utilizando um painel de 23 anticorpos monoclonais (SHAW *et al.*, 1989), realizado em colaboração com o Centro de Pesquisas Evandro Chagas, em Belém.

5.3 Obtenção de antígenos solúveis de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Inicialmente, formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), mantidas *in vitro*, foram expandidas em meio Schneider's (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 µg/ml-Sigma) até atingir a fase exponencial. Em seguida, foram sedimentadas por centrifugação a 800 X g durante 15 minutos a 4°C e lavadas três vezes com salina tamponada (PBS - pH 7,2). O "pellet" final foi mantido a -70°C até a utilização (BRITO *et al.*, 2000).

Para obtenção dos antígenos, as alíquotas armazenadas a -70°C foram descongeladas, ressuspendidas em água destilada contendo inibidores de proteases (metil-fenil-fluoreto-PMSF, 0,1 mM e ácido etilenodiaminotetra acético-EDTA, 2 mM), pepstatina A 0,001M e, em seguida, ultrassonicadas. A suspensão parasitária foi centrifugada a 10.000 X g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi removido e submetido a uma nova centrifugação a 100.000 X g durante 1 hora, à mesma temperatura. A partir do sobrenadante resultante, antígeno solúvel, foi feita a determinação protéica segundo o método de Bradford (1976) modificado por Read e Northcote (1981) e a concentração foi de 1,60 mg/ml. O antígeno solúvel ficou estocado a -20°C até o momento de uso nos ensaios de cultivo *in vitro*.

5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após a determinação protéica, alíquotas da fração antigênica solúvel foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida segundo Laemmli (1970). O gel de concentração foi preparado a uma concentração de 4,5% (p/v) de acrilamida, 125 mM de Tris-HCl (pH 6,8) e SDS 0,1% (p/v). O gel de separação foi preparado com 12,5% (p/v) de acrilamida, Tris-HCl 375mM (pH 8,8) e SDS 0,1% (p/v). A polimerização química dos géis ocorreu pela adição de persulfato de amônio e TEMED nas concentrações finais de 0,1% (p/v) e 0,7% (v/v), respectivamente. O tampão de corrida constituiu-se de Tris 38,7 mM, glicina 236 mM e SDS 0,1% (p/v) (pH 8,3). O tampão da amostra apresentou uma concentração final de Tris-HCl 62,5

mM (pH 6,8), SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (p/v). As proteínas foram solubilizadas em tampão de amostra por aquecimento a 100°C por três minutos. Em seguida, foram aplicados aproximadamente 15 µg da fração antigênica solúvel nos poços do gel. A eletroforese foi realizada em corrente constante (15mA). A coloração do gel foi feita utilizando-se uma solução contendo azul de Coomassie R-250 a 0,25% (p/v), metanol 45% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Finalmente, o gel foi descorado com uma solução contendo metanol 45% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

5.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico dos pacientes selecionados

Os grupos controle e de pacientes foram submetidos à coleta de 40 ml de sangue venoso periférico. Em relação aos pacientes, a coleta foi feita antes do tratamento e 12 meses após o término. O sangue foi coletado em tubo Vacutainer® estéril contendo heparina (10 U/ml). Cuidadosamente, em capela de fluxo laminar, foi adicionado a uma mistura de Ficoll-Hypaque (Amersham), na proporção de 2:1 em tubos de 50 ml. Após centrifugação a 400 X g durante 30 minutos a 20°C, um anel de PBMC foi obtido entre a mistura de Ficoll-Hypaque e o plasma. O plasma foi armazenado para ensaios sorológicos e as células coletadas para os procedimentos de estimulação antigênica. As células foram lavadas por centrifugação a 400 X g durante 30 minutos a 20°C com PBS estéril. Após esse procedimento, foram contadas em câmara de Neubauer utilizando azul de Trypan (Sigma), ajustando-se a concentração de interesse de acordo com cada ensaio realizado.

Para os testes imunológicos, 5,0 ml de sangue foi coletado em tubo sem anticoagulante para obtenção do soro. Todo procedimento foi realizado com material estéril obedecendo as normas de biossegurança (BRASIL, 2004).

5.6 Ensaio de proliferação celular

O ensaio de proliferação celular, também chamado de blastogênese, foi realizado segundo Gazzinelli *et al.* (1983), com o procedimento passando por algumas modificações. Células na quantidade de 2×10^5 /poço, obtidas de acordo com o item 5.5, foram cultivadas em triplicata em placas de cultura de tecido de 96 poços com fundo plano (TPP). O cultivo foi realizado utilizando-se meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 1% de L-glutamina 200 mM, 1% piruvato de sódio 100 mM, 0,2% de bicarbonato de sódio 7,5% e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 µg/ml) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF-Cultilab). As placas de cultura foram mantidas em estufa a 37°C/5% de CO₂ durante 3, 4, 5 e 6 dias. As culturas foram estimuladas com antígeno solúvel de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* nas concentrações 10, 5, 2,5 e 1,25 µg/ml e os mitógenos fitohemaglutinina (PHA - 5 µg/ml) e concanavalina A (ConA - 2,5 µg/ml), foram os controles positivos do ensaio.

O tempo de cultivo e as concentrações de uso para os estímulos *in vitro* dos antígenos solúveis e dos mitógenos foram definidos mediante ensaio cinético prévio (item 6.3.1). Culturas mantidas apenas com meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. A viabilidade celular foi verificada através da contagem das células viáveis pelo azul de Trypan.

Doze horas para o término do cultivo, foi adicionado a cada poço da placa 0,5 µCi de timidina tritiada ($[^3\text{H}]\text{TdR}$ - Amersham International, USA), diluída em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SBF. Ao final desse período, o material foi coletado através do coletor automático de células (Scatron) e depositado em papel de fibra de vidro (Whatman, AH). Após secagem do papel de fibra de vidro, o material foi transferido para frascos, acrescidos de 2 ml do líquido de cintilação (Fisher Scientific Company, USA). A radioatividade incorporada foi determinada no cintilador LKB-Wallace Rack Beta, onde cada amostra foi contada durante 1 minuto.

Os resultados foram expressos pelo índice de estimulação (IE), como sendo a média aritmética da contagem por minuto (cpm) das culturas estimuladas, dividida pela média aritmética da cpm das culturas não estimuladas, \pm desvio-padrão. O cut-off foi determinado pela média do grupo controle \pm dois desvios-padrões. Foram

considerados valores representativos da proliferação positiva, índices de estimulação maior ou igual a 3.

5.7 Obtenção de sobrenadante de cultura para identificação das citocinas

Suspensões celulares (10^6 células/poço), obtidas como descrito no item 5.5, foram depositadas em placas de 24 poços (TPP) em duplicata. Os estímulos utilizados foram os mesmos dos ensaios de proliferação celular (item 5.6) e as placas mantidas em estufa à 37°C/5% de CO₂ durante 24, 48 horas e 6 dias. Após o tempo de incubação, as placas foram centrifugadas (1800 x g por 10 min, a TA) e os sobrenadantes de cultura coletados e estocados a -70°C para posterior utilização.

5.8 Dosagem de citocinas secretadas nos sobrenadantes de cultura

A dosagem das citocinas IFN- γ e IL-10 nos sobrenadantes de cultura coletados, de acordo com o item anterior, foi determinada através do ELISA de captura. Os anticorpos monoclonais utilizados nesse ensaio foram do Kit OptEIA (BD Biosciences), sendo previamente titulados. Placas de ELISA (Nunc-96 poços) foram sensibilizadas com 50 μ l dos anticorpos anti-citocinas específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e incubadas por 18h a 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com 300 μ l/poço de PBS pH 7,2-Tween-20 0,05% (PBS-Tw), e incubadas com a solução bloqueadora contendo soro fetal bovino (PBS pH 7,2 + 10% SFB) por 1h, a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tw.

Os padrões das citocinas foram diluídos em PBS pH 7,2 + 10% SFB a partir da concentração de 1.000 pg/ml em diluição seriada com fator 2. Em seguida, 50 μ l da amostra e dos padrões foram adicionados em duplicata e a placa incubada por 2h a TA. Quando necessário, as amostras foram diluídas em PBS pH 7,2 + 10% SFB. As placas foram lavadas 6 vezes com PBS-Tw e 50 μ l dos anticorpos biotinilados específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em PBS pH 7,2 + 10% SFB foram adicionados por 1h30min, a TA. Após nove lavagens com PBS-Tw, foi

adicionado 100 µl da solução reveladora contendo ABTS - 2,2-azino-de [sulfato(6)de 3-etil benzitiazolina] (KPL). A reação foi bloqueada com 50 µl de ácido sulfúrico 1 M e a leitura realizada no espectrofotômetro (Bio-Rad 3550) a 415 nm. As concentrações das amostras foram calculadas na região linear da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/ml, utilizando o software Microplate Manager, versão 4.0 (Bio-Rad laboratories).

5.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no Laboratório de Métodos Quantitativos do Núcleo de Saúde Coletiva do CPqAM, empregando-se testes não paramétricos. Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas ou gráficos incluindo também o uso de algumas medidas descritivas como mínimo, máximo, mediana, média e desvio padrão. Para análise comparativa intra-grupos foi utilizado o teste dos postos sinalizados de Wilcoxon e para a análise entre grupos o teste U de Mann-Whitney. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2000 e o SPSS 8.0.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da população de estudo

Os participantes do estudo foram avaliados segundo os critérios de faixa etária, sexo, localidade de origem, forma clínica, número de lesões, tempo de evolução da doença, diagnósticos parasitológicos e imunológicos. Essas informações estão descritas nas Tabelas 2 e 3.

Foram selecionados 15 indivíduos com LTA ativa que obedeceram os critérios de inclusão e exclusão, sendo 09 pacientes do sexo masculino (60%) e 06 do sexo feminino (40%). A faixa etária variou de 13 a 63 anos com uma média de 32 anos.

Os pacientes foram provenientes do município de Moreno (n = 10), de Amaraji (n = 01), de Vitória de Santo Antão (n = 01), e de Aldeia (n = 03), respectivamente, situados a 28 Km, 96 Km, 51 Km e 10 Km da cidade do Recife. Todas as localidades pertencem a região da Zona da Mata, sendo consideradas áreas endêmicas em PE.

Apenas um paciente apresentou a forma cutânea disseminada com mais de 20 lesões papulosas, distribuídas por toda superfície corporal. Um paciente apresentou a forma mucocutânea. Todos os outros pacientes apresentaram lesões ulceradas com bordas elevadas e fundo granulomatoso, distribuídas em áreas descobertas do corpo. Em relação ao número de lesões, 60% apresentaram apenas uma lesão, 13,3% apresentaram duas lesões e 20% três lesões. O tempo de evolução da doença, ou seja, do surgimento da doença até a procura do núcleo de saúde dos municípios variou de um mês até 12 meses.

Tabela 2: Características dos pacientes em relação a localidade de origem, sexo, faixa etária, forma clínica, número de lesões e tempo de evolução da doença.

Paciente	Localidade	Sexo	Idade	Forma Clínica	Nº Lesão	Evolução (meses)
1	Moreno	F	46	Cutânea localizada	03	1
2	Moreno	F	38	Cutânea localizada	01	1
3	Moreno	M	30	Cutânea localizada	01	2
4	Moreno	M	34	Cutânea localizada	01	2
5	Moreno	F	25	Cutânea localizada	01	1
6	Amaraji	F	15	Cutânea disseminada	>20	NI
7	Moreno	M	46	Cutânea localizada	01	1
8	Moreno	M	17	Cutânea localizada	03	1
9	Moreno	M	20	Cutânea localizada	02	3
10	Aldeia	M	63	Cutânea localizada	02	1
11	Aldeia	M	28	Cutânea localizada	01	2
12	Aldeia	M	30	Cutânea localizada	01	1
13	Vitória de Santo Antão	F	24	Cutânea localizada	01	2
14	Moreno	M	51	Mucocutânea	01	1
15	Moreno	F	13	Cutânea localizada	03	12

F= feminino; M= masculino; NI= não informado.

Todos os pacientes foram diagnosticados como positivos em pelo menos um dos testes realizados. A intradermoreação de Montenegro apresentou resultado positivo, ou seja, endureção igual ou maior que 5 mm em 92,8% dos pacientes. Um paciente apresentou endureção menor que 5 mm; portanto, resultado negativo. Por motivos operacionais, apenas um paciente não realizou o teste. Vale ressaltar que esses dois pacientes foram positivos nos outros testes. A IDRM apresentou uma forte resposta de hipersensibilidade cutânea, ou seja, endureções maiores que 10 mm na grande maioria dos pacientes (71,4%).

Além da IDRM, foram realizadas a IFI em 14 pacientes, apresentando 71,4% de positividade; e a PCR, em 13 pacientes, com 92,3% de positividade (Figura 4). A pesquisa direta apresentou 53% de positividade nos 15 pacientes avaliados. Em sete indivíduos (46,6%), o parasito foi isolado em meio de cultura. Após análise por anticorpos monoclonais, realizado em colaboração com o Centro de Pesquisas Evandro Chagas, em Belém, o parasito foi identificado como *L. (V.) braziliensis*.

Tabela 3: Resultados laboratoriais dos pacientes.

Paciente	IDRM (mm)	Pesquisa Direta	IFI	PCR	Isolamento
1	10	+	-	+	+
2	20	-	+	NR	+
3	20	+	+	+	A
4	15	+	+	+	A
5	15	+	+	+	A
6	NR	-	+	+	A
7	10	-	-	+	+
8	5	+	-	+	A
9	10	-	+	+	A
10	20	+	NR	+	+
11	10	+	+	-	+
12	15	-	-	+	A
13	-	+	+	+	+
14	5	-	+	+	+
15	6	-	+	NR	A

IDRM= Intradermorreação de Montenegro; IFI= Imunofluorescência; PCR= Reação em cadeia de polimerase; += positivo; - = negativo; NR= não realizado; A= em andamento.

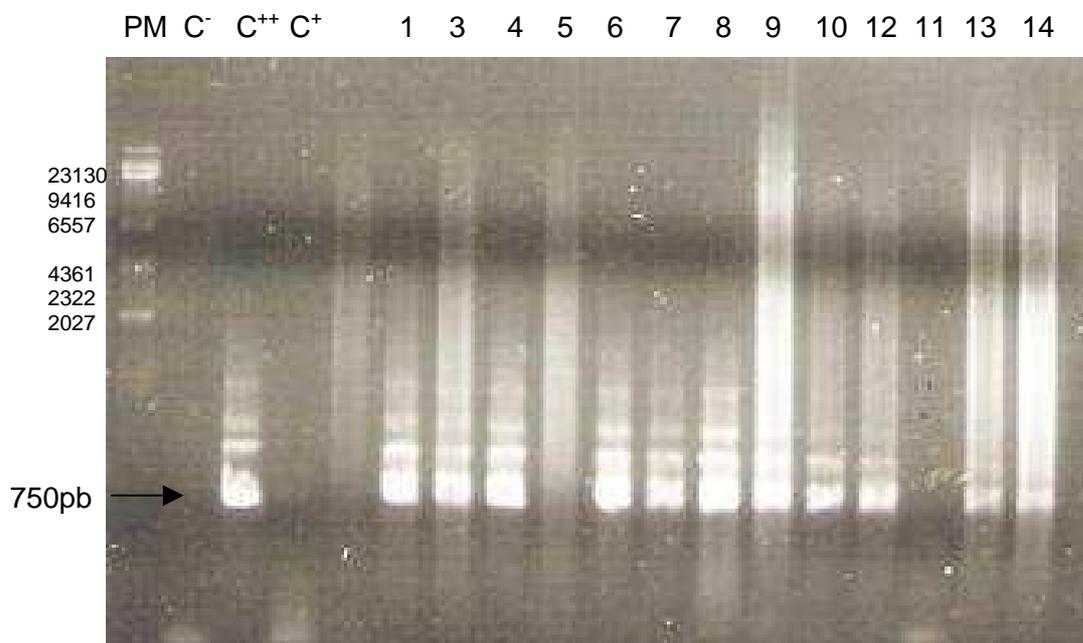


Figura 4 – Gel de agarose (1%) das amostras de biópsias das lesões dos pacientes. PM (Peso molecular λ + Hind III), C⁻ (controle negativo), C⁺⁺ (controle positivo 1ng), C⁺ (controle positivo 1pg).

Em relação ao tratamento com o Glucantime®, realizado como descrito na metodologia, todos os pacientes apresentaram cicatrização completa das lesões ao final da terapêutica (Figura 5). O esquema terapêutico na maioria dos pacientes (66,7%) foi composto por apenas uma série (20 a 30 dias). Em 26,7% e 6,6% dos pacientes o tratamento foi composto por duas e três séries, respectivamente. Após o término do tratamento, os pacientes foram acompanhados por um período de 12 meses para confirmação da cura clínica e verificação do aparecimento de novas lesões e recidivas. Além disso, foram novamente submetidos à coleta de sangue venoso para a avaliação após tratamento.



Figura 5: Fotos representativas da cicatrização completa das lesões dos pacientes.

O grupo controle foi representado por 10 indivíduos saudáveis de área não endêmica, sem histórico da doença, com idade variando de 20 a 52 anos, com média de 31 anos.

6.2 Perfil eletroforético do antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*

A fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis* foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida e apresentou proteínas cujos pesos moleculares variaram entre 66 e 16 kDa (Figura 6) quando comparadas ao peso molecular padrão (Sigma).

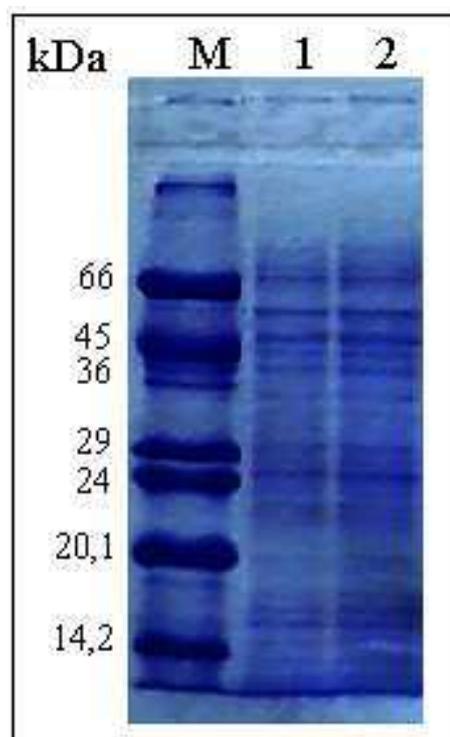


Figura 6: SDS-PAGE de proteínas solúveis de *L. (V.) braziliensis*. Nos poços 1 e 2 foram depositados 10 µg e 15 µg do antígeno, respectivamente. M= marcadores de peso molecular em kDa (66 – albumina bovina; 45 – Ovalbumina; 36 – anidrase carbônica; 29 – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; 24 – tripsinogênio; 20,1 – inibidor de tripsina e 14,2 – α -lactoalbumina).

6.3 Ensaio de Proliferação Celular

6.3.1 Padronização da Proliferação Celular

Com a finalidade de estabelecer o tempo de cultivo e a concentração da fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis* ideais para os ensaios de proliferação *in vitro* de PBMC, foi realizado um ensaio prévio.

Foram analisadas células de quinze pacientes com LTA ativa oriundos de área endêmica de PE antes do tratamento quimioterápico e dez indivíduos sadios (grupo controle). A resposta linfoproliferativa de PBMC foi avaliada na presença de diferentes concentrações do antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/ml}$) e dos mitógenos fitohemaglutinina-PHA (5 $\mu\text{g/ml}$) e Concanavalina A-ConA (2,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 3, 4, 5 e 6 dias. Os resultados foram expressos pelo índice de estimulação (IE), sendo considerados valores representativos da proliferação celular, índices de estimulação maior ou igual a 3.

As respostas de PBMC aos mitógenos ConA (2,5 $\mu\text{g/ml}$) e PHA (5 $\mu\text{g/ml}$) foram positivas em todos os grupos avaliados, não havendo diferença significativa entre pacientes e controle nos diferentes dias de cultivo. O resultado indicou que a resposta dessas células a mitógenos inespecíficos não foi suprimida (Tabela 4).

Tabela 4: Respostas de PBMC aos mitógenos ConA (2,5 $\mu\text{g/ml}$) e PHA (5 $\mu\text{g/ml}$) entre os pacientes (Pcs) e o grupo controle (Cts) durante 3, 4, 5 e 6 dias de cultivo. Os resultados foram expressos pelo índice de estimulação (IE) \pm desvio-padrão.

Mitógenos	Dias de cultivo							
	3		4		5		6	
	Pcs	Cts	Pcs	Cts	Pcs	Cts	Pcs	Cts
ConA	223 \pm 152	424 \pm 147	78 \pm 63	194 \pm 108	53 \pm 69	55 \pm 50	9 \pm 13	13 \pm 19
PHA	166 \pm 151	286 \pm 218	76 \pm 86	129 \pm 92	51 \pm 74	43 \pm 29	13 \pm 30	9 \pm 14

Em PBMC de todos os pacientes, ficou evidenciada a proliferação das células estimuladas pelo antígeno solúvel, nas concentrações 10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/ml}$ e nos 3^o, 4^o, 5^o e 6^o dias de cultivo. No grupo controle não houve resposta proliferativa ao estímulo antigênico (Figuras 7, 8, 9, 10 e 11).

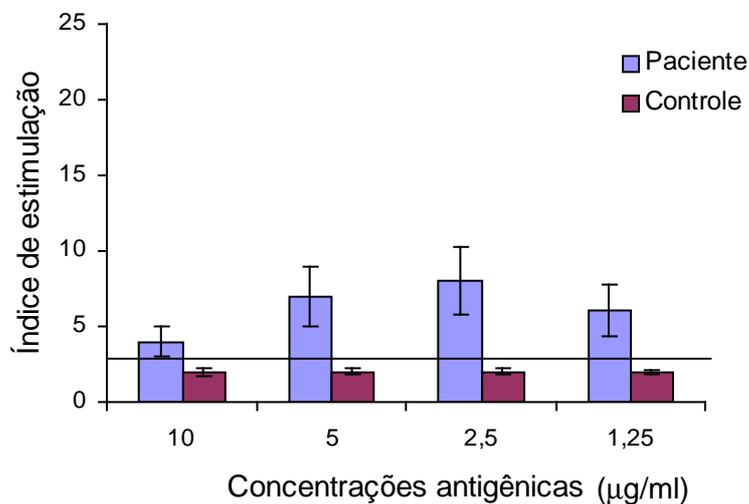


Figura 7: Gráfico comparativo da resposta de PBMC dos pacientes de LTA e do grupo controle ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* em 3 dias de cultivo. A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE. As barras verticais representam o erro padrão e a linha horizontal representa o *cut off*.

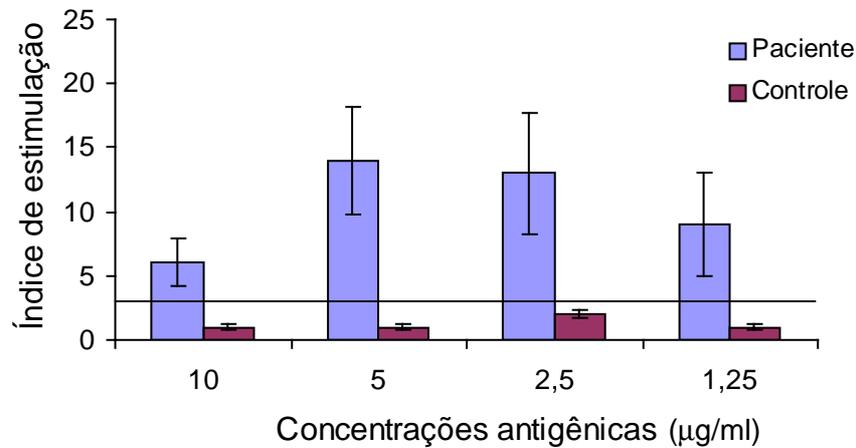


Figura 8: Gráfico comparativo da resposta de PBMC dos pacientes de LTA e do grupo controle ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* em 4 dias de cultivo. A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE. As barras verticais representam o erro padrão e a linha horizontal representa o *cut off*.

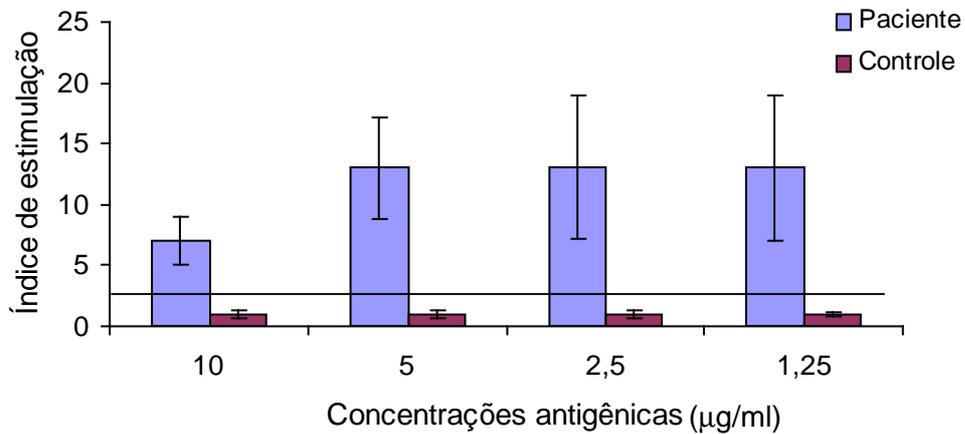


Figura 9: Gráfico comparativo da resposta de PBMC dos pacientes de LTA e do grupo controle ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* em 5 dias de cultivo. A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE. As barras verticais representam o erro padrão e a linha horizontal representa o *cut off*.

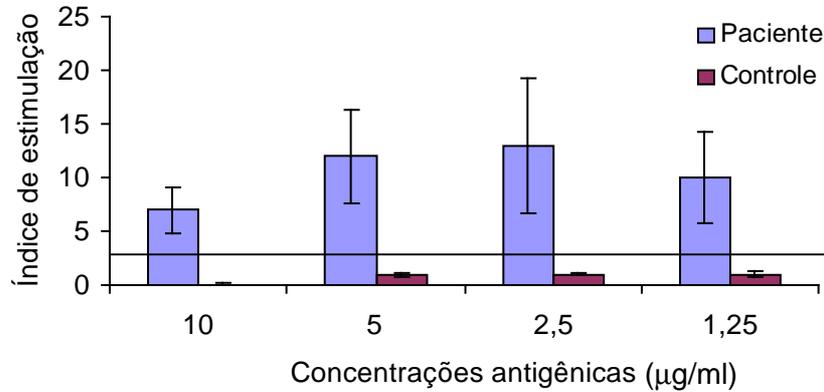


Figura 10: Gráfico comparativo da resposta de PBMC dos pacientes de LTA e do grupo controle ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* em 6 dias de cultivo. A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE. As barras verticais representam o erro padrão e a linha horizontal representa o *cut off*.

Comparando-se os IE dos pacientes com o grupo controle, observou-se que todas as concentrações antigênicas e todos os tempos de cultivo apresentaram diferença significativa. Desta maneira, foi possível optar pela concentração 1,25 µg/ml e pelo 5º dia de cultivo para os ensaios de proliferação antes e 12 meses após o tratamento quimioterápico. Vale ressaltar que neste dia (5º), as células apresentavam-se viáveis.

6.3.2 Proliferação celular antes e após tratamento quimioterápico

A resposta proliferativa foi avaliada nas culturas de PBMC dos pacientes com LTA antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico e no grupo controle. Os estímulos foram realizados na presença da ConA (2,5 µg/ml), PHA (5 µg/ml) e do antígeno solúvel (1,25 µg/ml) no 5^o dia de cultivo.

Como controles positivos do teste, os mitógenos ConA e PHA estimularam fortemente a linfoproliferação de PBMC no grupo controle e nos pacientes, antes e após tratamento. Analisando a resposta frente ao estímulo com ConA, as médias dos IE dos grupos foram semelhantes. Em relação a PHA, a média do IE da linfoproliferação dos pacientes após tratamento foi mais elevada. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos frente a esses mitógenos (Tabelas 5 e 6; Figuras 11 e 12).

Tabela 5: Estatísticas descritivas das respostas linfoproliferativas de PBMC ao mitógeno ConA (2,5 µg/ml) entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle. A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE.

ConA								
Grupos	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio	P ¹	P ²
Controle	10	9	162	39	55,00	49,61		
Pcs-AT	15	3	252	13	52,60	69,43	0,446	
Pcs-PT	15	2	189	20	43,87	58,24	0,263	0,733

P¹ = refere-se ao teste Mann-Whitney (comparação entre os pacientes e o grupo controle)

P² = refere-se ao teste Wilcoxon (comparação entre os pacientes antes e após tratamento)

N= número da amostra

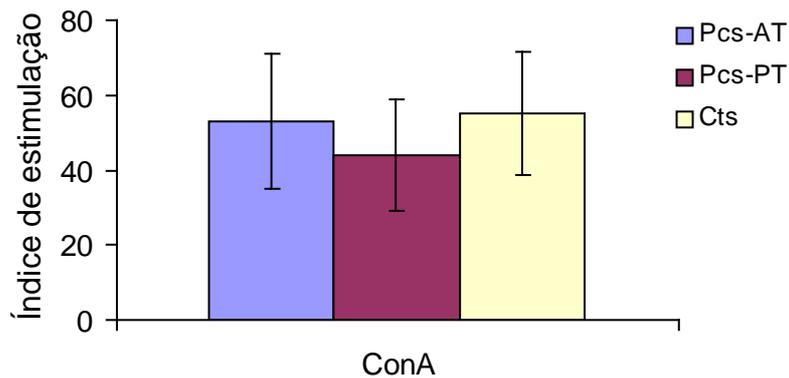


Figura 11: Gráfico comparativo da resposta linfoproliferativa de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT) e após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle (Cts) estimulado com ConA (2,5 µg/ml). A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE. As barras verticais representam o erro padrão.

Tabela 6: Estatísticas descritivas das respostas linfoproliferativas de PBMC ao mitógeno PHA (5 µg/ml) entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle. A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE.

PHA								
Grupos	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio	P ¹	P ²
Controle	10	13	99	35	43,10	28,81		
Pcs-AT	15	1	272	16	51,47	74,22	0,311	
Pcs-PT	15	5	909	80	150,13	235,42	0,144	0,156

P¹ = refere-se ao teste Mann-Whitney (comparação entre os pacientes e o grupo controle)

P² = refere-se ao teste Wilcoxon (comparação entre os pacientes antes e após tratamento)

N= número da amostra

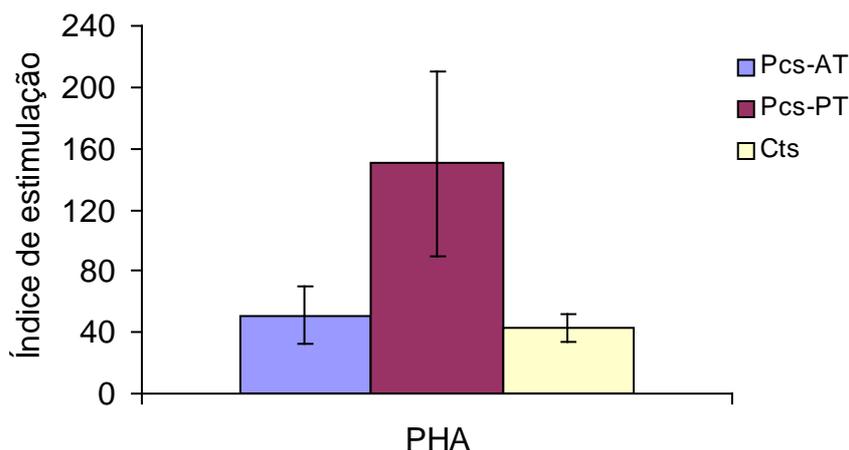


Figura 12: Gráfico comparativo da resposta linfoproliferativa de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT) e após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle (Cts) estimulado com PHA (5 µg/ml). A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE. As barras verticais representam o erro padrão.

Em relação ao estímulo com o antígeno solúvel, nenhum indivíduo do grupo controle apresentou resposta proliferativa. As culturas de PBMC dos pacientes antes e após tratamento proliferaram intensamente ao antígeno. Antes do tratamento 86,6% dos pacientes apresentaram resposta proliferativa positiva (IE≥3) e após tratamento, 80%.

Embora constatado pequeno aumento no IE após tratamento, não foi observado diferença significativa entre os pacientes ($p = 0,944$). Comparando-se os IEs dos pacientes antes e após tratamento com o grupo controle, houve diferença significativa em relação aos níveis de proliferação ($p < 0,001$) (Tabela 7 e Figura 13).

Tabela 7: Estatísticas descritivas das respostas linfoproliferativas de PBMC ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (1,25 $\mu\text{g/ml}$) entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle. A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE.

Grupos	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio	P ¹	P ²
Controle	10	1	2	1	1,20	0,42		
Pcs-AT	15	1	93	5	12,93	22,95	<0,001	
Pcs-PT	15	1	52	4	15,60	17,60	0,001	0,944

P¹ = refere-se ao teste Mann-Whitney (comparação entre os pacientes e o grupo controle)
 P² = refere-se ao teste Wilcoxon (comparação entre os pacientes antes e após tratamento)
 N= número da amostra

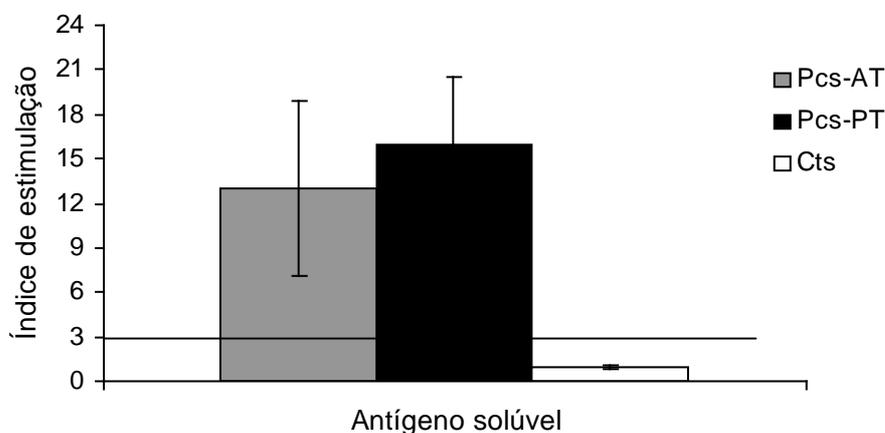


Figura 13: Gráfico comparativo da resposta linfoproliferativa de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT) e após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle (Cts) ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (1,25 $\mu\text{g/ml}$). A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE. As barras verticais representam o erro padrão e a linha horizontal representa o *cut off*.

6.4 Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura

6.4.1 Padronização do ensaio de sobrenadante de cultura

Para estabelecer a melhor concentração da fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis* e o melhor tempo de cultivo para os ensaios de sobrenadante de cultura, foi realizado um ensaio prévio durante 24 horas, 48 horas e 6 dias de cultura, utilizando as mesmas concentrações antigênicas utilizadas nos ensaios de proliferação celular (item 6.3.1). A concentração do antígeno que apresentou as maiores médias de densidades ópticas (DOs) em PBMC dos pacientes, após a realização do ensaio do ELISA para detecção das citocinas, foi a escolhida. O tempo de cultivo para a coleta do sobrenadante também foi avaliado segundo este mesmo critério.

Todas as concentrações antigênicas estimularam a produção de altos níveis de IFN- γ e IL-10 nos pacientes, quando comparado com o grupo controle, durante 24 e 48 horas ($p < 0,05$). Durante 6 dias de cultura não foi observado diferença significativa na produção das citocinas entre os grupos (Figuras 14 e 15).

Assim, a concentração do antígeno escolhida para o ensaio de sobrenadante de cultura foi 1,25 $\mu\text{g/ml}$. Portanto, a mesma concentração utilizada no ensaio de proliferação celular. O tempo de cultivo de 48 horas ficou estabelecido para medição de IL-10 e IFN- γ .

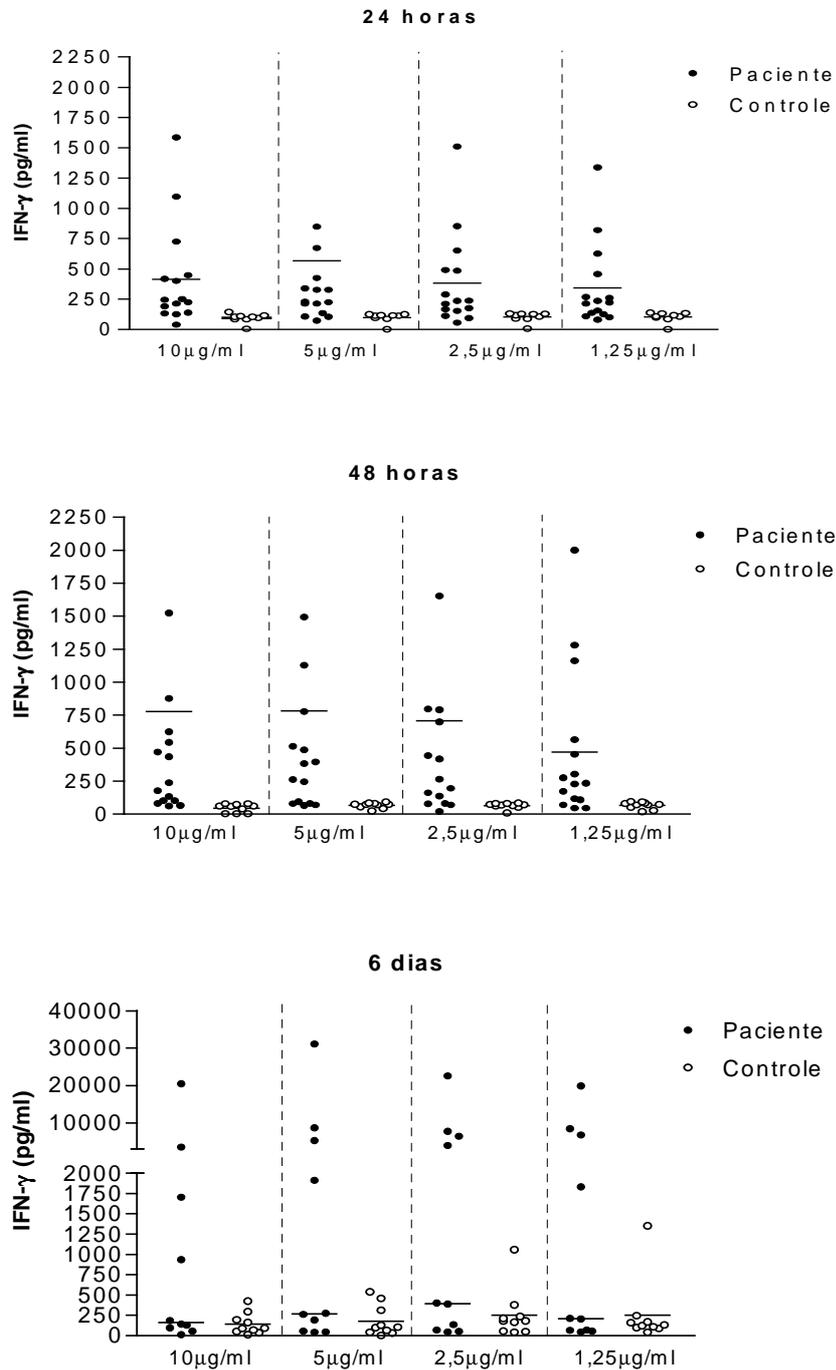


Figura 14: Gráficos da padronização da produção de IFN- γ durante 24h, 48h e 6 dias dos pacientes de LTA e do grupo controle frente as diferentes concentrações do antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. As barras horizontais representam a média dos grupos.

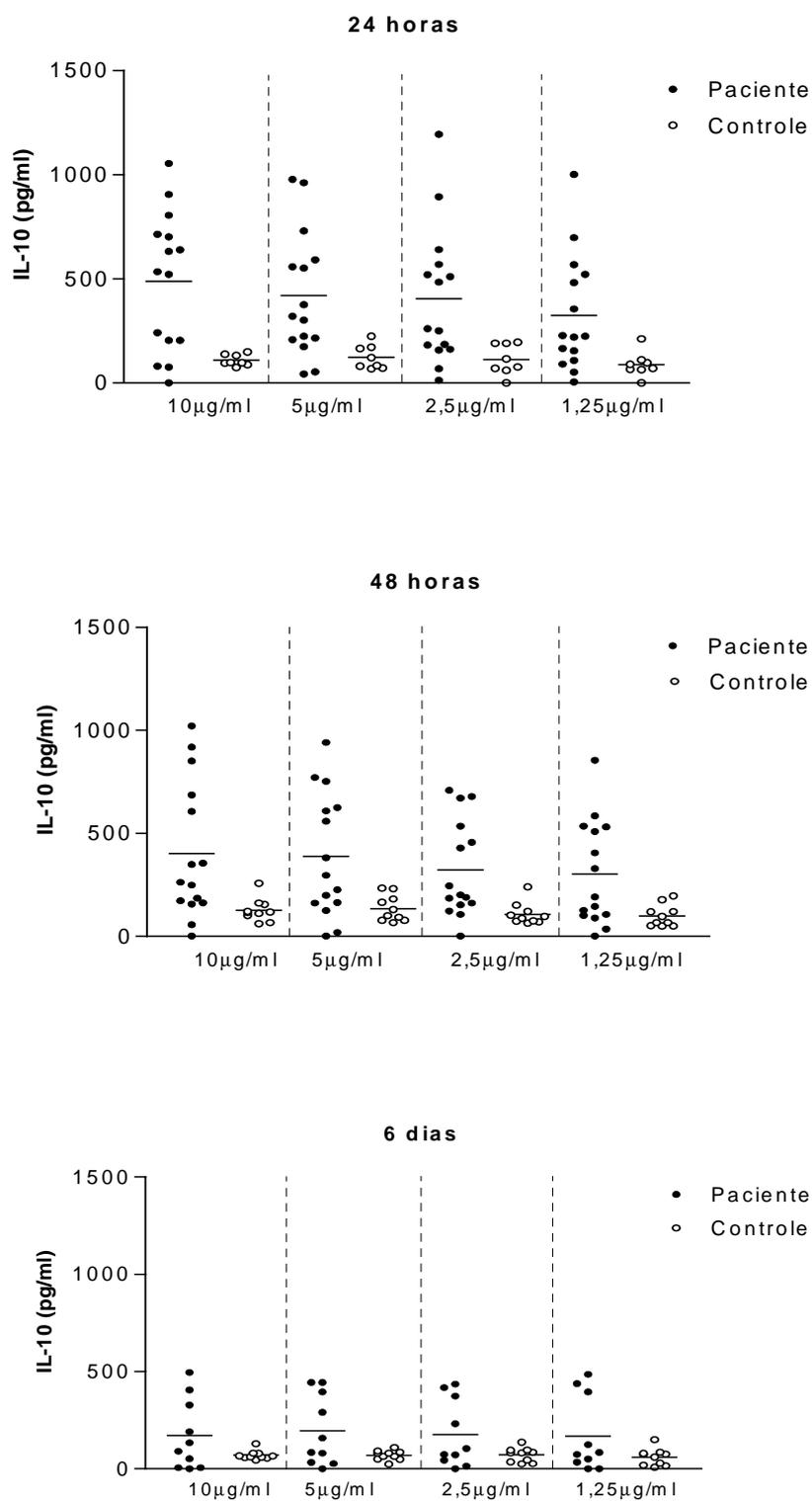


Figura 15: Gráficos da padronização da produção de IL-10 durante 24h, 48h e 6 dias dos pacientes de LTA e do grupo controle frente as diferentes concentrações do antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. As barras horizontais representam a média dos grupos.

6.4.2 Avaliação da produção de IFN- γ antes e após tratamento

A produção de IFN- γ (pg/ml) foi determinada no sobrenadante de cultura de PBMC após 48 horas de estímulo, na presença de 1,25 μ g/ml do antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*, dos mitógenos ConA (2,5 μ g/ml) e PHA (5 μ g/ml), além da ausência de estímulo. A avaliação da produção de IFN- γ foi realizada antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico.

As estatísticas descritivas e o gráfico referente a quantificação dessa produção estão indicados na Tabela 8 e Figura 16. Assim como na proliferação, resultados similares foram encontrados entre os pacientes e o grupo controle após estímulo com ConA, não havendo diferença significativa na detecção de IFN- γ .

Sob estímulo de PHA não foi observada diferença significativa entre os pacientes e o grupo controle em relação a produção de IFN- γ . No grupo dos pacientes, a produção foi significativamente mais elevada após tratamento, comparado-se antes de iniciar o tratamento.

Não foi detectada produção de IFN- γ nas culturas de PBMC do grupo controle sem estímulo. Embora pôde ser observada mínima produção de IFN- γ em PBMC de pacientes, antes e após tratamento, não foi evidenciada diferença significativa. Comparando o grupo controle com os pacientes, observa-se diferença significativa apenas com os pacientes antes do tratamento.

Tabela 8: Estatísticas descritivas da produção de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC aos mitógenos ConA (2,5 μ g/ml), PHA (5 μ g/ml) e culturas sem estímulo entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle.

ConA								
Grupos	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio	P ¹	P ²
Controle	10	0	22144	9920	10101,60	7436,46		
Pcs-AT	15	992	31616	7616	8976,00	8217,36	0,567	
Pcs-PT	15	0	21808	1944	4563,20	6209,45	0,062	0,125

PHA								
Grupos	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio	P ¹	P ²
Controle	10	0	2808	566	867,20	912,80		
Pcs-AT	15	0	2088	448	588,27	530,54	0,643	
Pcs-PT	15	32	8312	1520	2775,47	2838,73	0,115	0,015

Sem estímulo								
Grupos	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio	P ¹	P ²
Controle	10	0	0	0	0,00	0,00		
Pcs-AT	15	0	67	31	27,53	23,07	0,004	
Pcs-PT	15	0	282	0	38,33	79,44	0,285	0,859

P¹ = refere-se ao teste Mann-Whitney (comparação entre os pacientes e o grupo controle)

P² = refere-se ao teste Wilcoxon (comparação entre os pacientes antes e após tratamento)

N= número da amostra

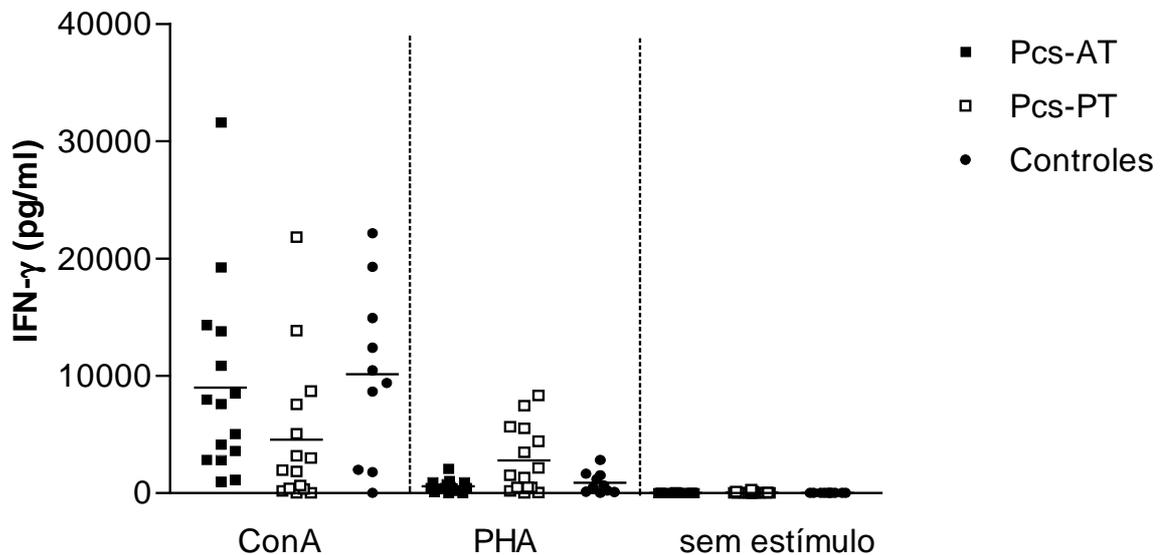


Figura 16: Gráfico da quantificação da produção de IFN- γ (pg/ml) em sobrenadante de cultura de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT), após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle na presença dos mitógenos ConA, PHA e nas culturas sem estímulo. As barras horizontais representam a média dos grupos.

Como indicado na Tabela 9 e Figura 17, os resultados demonstram que os pacientes com LTA, antes e após tratamento produziram uma maior quantidade de IFN- γ em relação ao grupo controle, quando as PBMC foram estimuladas com o antígeno. No entanto, a diferença significativa ficou evidenciada apenas entre os pacientes antes do tratamento comparado ao grupo controle.

Também pode ser observado, comparando-se os pacientes antes e após tratamento, uma diminuição desta citocina após o término do tratamento. Embora observado esse resultado, verificou-se ausência de diferença significativa.

Tabela 9: Estatísticas descritivas da produção de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (1,25 μ g/ml) entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle.

Grupos	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio	P ¹	P ²
Controle	10	18	95	70.5	65,5	25,86		
Pcs-AT	15	0	2000	234	465	572,80	0,005	
Pcs-PT	15	0	1013	70	262	348,55	0,978	0,078

P¹ = refere-se ao teste Mann-Whitney (comparação entre os pacientes e o grupo controle)

P² = refere-se ao teste Wilcoxon (comparação entre os pacientes antes e após tratamento)

N= número da amostra

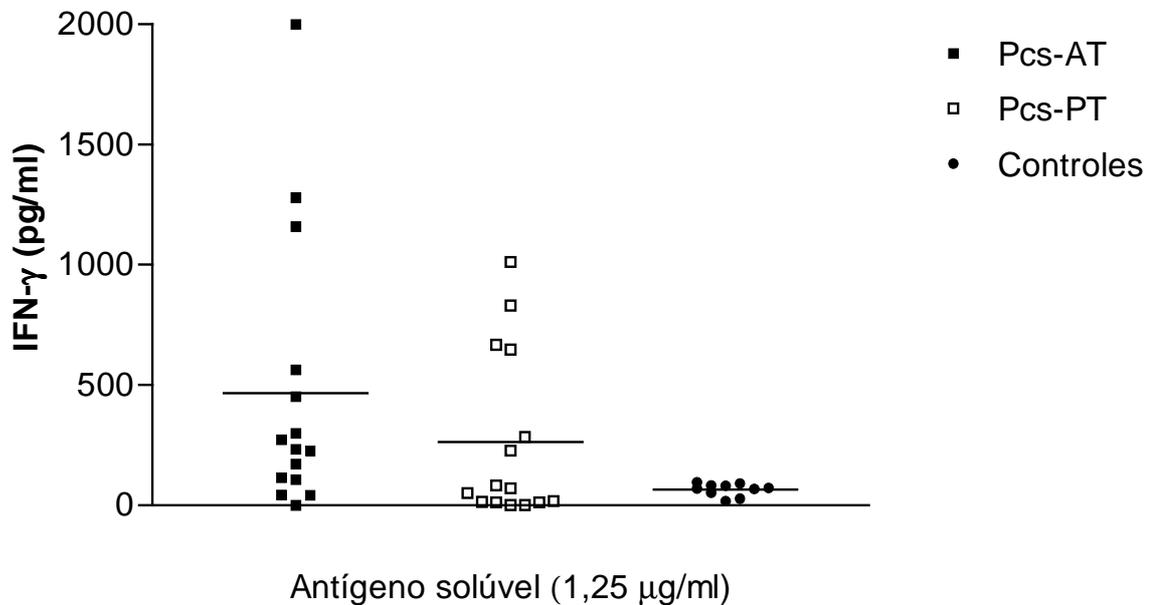


Figura 17: Gráfico da quantificação da produção de IFN- γ (pg/ml) em sobrenadante de cultura de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT), após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle na presença de 1,25 μ g/ml do antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. As barras horizontais representam a média dos grupos.

6.4.3 Avaliação da produção de IL-10 antes e após tratamento

A produção de IL-10 (pg/ml) foi determinada no sobrenadante de cultura de PBMC após 48 horas de estímulo, na presença de 1,25 µg/ml do antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*, dos mitógenos ConA (2,5 µg/ml) e PHA (5 µg/ml), além da ausência de estímulo. A avaliação da produção de IL-10 foi realizada antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico. As estatísticas descritivas e o gráfico referente a quantificação dessa produção estão indicados na Tabela 10 e Figura 18.

A produção de IL-10, após estímulo com os mitógenos ConA e PHA, foi mais elevada nos pacientes comparado ao grupo controle. Avaliando a produção desta citocina após estímulo com a ConA, observa-se que entre os pacientes houve uma maior produção após tratamento, inclusive com diferença significativa. As médias da quantificação de IL-10 entre os pacientes e o grupo controle também apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Após estímulo com a PHA, PBMC do grupo controle apresentou menor produção de IL-10 em relação aos pacientes. Diferença significativa foi constatada comparando-se controle com os pacientes após tratamento. Analisando o grupo de pacientes, observa-se que a produção foi significativamente mais elevada após tratamento quando compara-se antes de iniciar o tratamento.

Embora os pacientes tenham apresentado níveis mais elevados de IL-10 nas culturas sem estímulo, quando comparado ao grupo controle, não foi constatada diferença significativa.

Tabela 10: Estatísticas descritivas da produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC aos mitógenos ConA (2,5 µg/ml), PHA (5 µg/ml) e culturas sem estímulos entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle.

ConA								
Grupos	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio	P ¹	P ²
Controle	10	168	740	535	526	155,78		
Pcs-AT	15	104	2016	1072	1056,53	497,45	0,001	
Pcs-PT	15	640	3584	1312	1618,13	866,66	<0,001	0,031
PHA								
	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio	P ¹	P ²
Controle	10	152	488	318	318	114,44		
Pcs-AT	15	146	1554	368	489,07	390,94	0,461	
Pcs-PT	15	248	2488	720	920,93	632,16	0,002	0,047
Sem estímulo								
	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio	P ¹	P ²
Controle	10	0	112	84,5	72	39,45		
Pcs-AT	15	37	319	73	124,60	101,52	0,567	
Pcs-PT	15	0	622	88	142,80	176,29	0,765	0,820

P¹ = refere-se ao teste Mann-Whitney (comparação entre os pacientes e o grupo controle)

P² = refere-se ao teste Wilcoxon (comparação entre os pacientes antes e após tratamento)

N= número da amostra

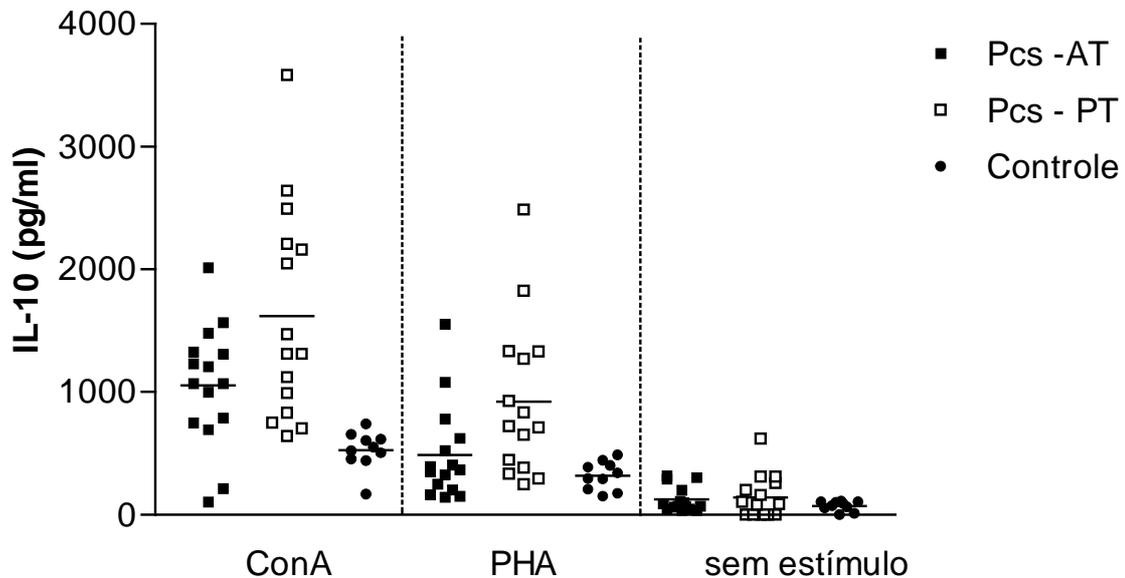


Figura 18: Gráfico da quantificação da produção de IL-10 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT), após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle na presença dos mitógenos ConA, PHA e nas culturas sem estímulo. As barras horizontais representam a média dos grupos.

Os níveis de IL-10, frente à estimulação com o antígeno foram mais elevados nos pacientes comparado ao grupo controle. Esse resultado pode ser observado na Tabela 11 e Figura 19. Nos pacientes avaliados, embora a produção desta citocina tenha sido mais elevada após tratamento, não foi constatada diferença significativa ($p = 0,307$). Diferença significativa foi encontrada comparando-se os pacientes após o tratamento com o grupo controle ($p = 0,008$).

Tabela 11: Estatísticas descritivas da produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (1,25 $\mu\text{g/ml}$) entre os pacientes antes (Pcs-AT) e após tratamento (Pcs-PT) e o grupo controle.

Variáveis	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio	P ¹	P ²
Controle	10	49	195	81	99	53,35		
Pcs-AT	15	0	854	144	263,33	253,08	0,091	
Pcs-PT	15	30	1316	312	353,73	324,04	0,008	0,307

P¹ = refere-se ao teste Mann-Whitney (comparação entre os pacientes e o grupo controle)

P² = refere-se ao teste Wilcoxon (comparação entre os pacientes antes e após tratamento)

N= número da amostra

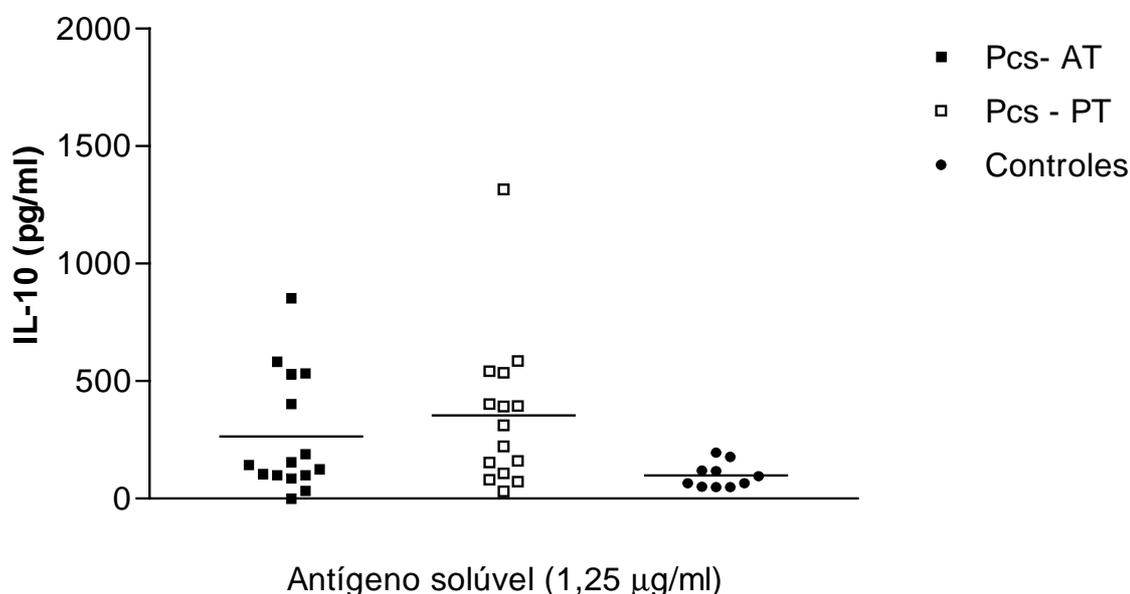


Figura 19: Gráfico da quantificação da produção de IL-10 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT), após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle na presença de 1,25 $\mu\text{g/ml}$ do antígeno solúvel de *L (V.) braziliensis*. As barras horizontais representam a média dos grupos.

7 DISCUSSÃO

No Brasil, a *Leishmania (Viannia) braziliensis* é amplamente distribuída por todo território nacional, sendo considerada uma das espécies mais importantes para a saúde pública. Além de ser responsável pela maioria dos casos de LTA no país, tem a capacidade de causar desde a forma cutânea localizada até graves lesões mucocutâneas mutilantes (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Na região Nordeste, PE aparece como o quarto Estado com maior número de casos notificados. A doença aparece em crescente expansão com aumento na notificação de 14 para 733, no período de 1980 a 2004. Mais de 60% desses casos ocorrem na região da Zona da Mata (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; SNVS/PE, 2006).

Todos os quinze pacientes participantes deste estudo foram provenientes de áreas endêmicas na região da Zona da Mata de PE. Foi observado uma prevalência da doença em indivíduos do sexo masculino (60%), adultos jovens, com uma média de idade de 32 anos e trabalhadores da zona rural. A LTA tem causado significativa morbidade em nosso país, atingindo predominantemente indivíduos do sexo masculino em idade produtiva. Em geral, está associada à áreas rurais, sobretudo nas atividades de exploração e desmatamentos em florestas e em atividades agrícolas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2006).

Em relação às formas clínicas observadas nesse estudo, a grande maioria apresentou a forma cutânea localizada com lesões ulceradas em áreas descobertas do corpo (86,6%). Apenas um indivíduo apresentou a forma mucocutânea e um a forma disseminada. Este tinha mais de 20 lesões distribuídas pela superfície corporal.

A existência das lesões nas áreas descobertas do corpo, normalmente membros superiores e inferiores, pode ser explicada pelas atividades ocupacionais em áreas rurais. A grande ocorrência da forma cutânea localizada na LTA em nosso estudo está de acordo com outros trabalhos, tanto em PE como em outros Estados (ANDRADE *et al.*, 2005; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; COSTA *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2006).

Já a tendência para a redução do número de casos de leishmaniose mucocutânea é provavelmente devido ao melhor conhecimento da LTA, levando a um correto diagnóstico e tratamento precoce da infecção (GONTIJO *et al.*, 2002).

O tempo de incubação da doença em 57,14% dos pacientes foi de 30 dias e 28,57% apresentaram a doença em 60 dias. Estudos realizados em outros Estados, demonstraram um tempo de incubação de 47 dias na Bahia e de 90 dias em Belo Horizonte (CARVALHO *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2003). A leishmaniose cutânea surge após um período de incubação variando de dez dias a três meses. O acometimento mucoso pode surgir com a lesão cutânea ainda em atividade ou anos após a cicatrização e, geralmente, está associado com a demora na cicatrização da lesão primária e o tratamento inicial inadequado (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Além disso, a LTA é uma doença complexa devido a existência de várias espécies do parasito e do vetor, assim como a relação parasito-hospedeiro. Esse fato leva à necessidade de novas ferramentas que auxiliem na determinação do prognóstico e de um diagnóstico eficiente.

O diagnóstico da LTA demonstra dificuldades pelo fato de suas manifestações clínicas se assemelharem a lesões de outras doenças e a existência de limitações nos métodos de diagnósticos convencionais. Ainda não há um método diagnóstico que possa ser usado como padrão-ouro. Portanto, o diagnóstico é realizado pela associação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (BRITO *et al.*, 2000; 2001; KAR, 1995).

O diagnóstico dos pacientes neste estudo foi confirmado pela realização da pesquisa direta, do isolamento do parasito em meio de cultura, da IDRM, IFI e PCR. Os pacientes do presente estudo apresentaram positividade em pelo menos um teste diagnóstico. Por razões operacionais, alguns pacientes não puderam ser diagnosticados por todos os métodos empregados.

A IDRM apresentou resultado positivo, ou seja, enduração igual ou maior que 5 mm em 92,8% dos pacientes. Esses resultados estão de acordo com outros autores que relataram uma sensibilidade em torno de 90% para casos de LTA (FABER *et al.*, 2003; FOLLADOR *et al.*, 1999; GONTIJO *et al.*, 2002; MEDEIROS *et al.*, 2002; STOLF *et al.*, 1993; VEGA-LÓPEZ, 2003).

Apenas um paciente apresentou resposta negativa ao teste de IDRM. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de ser infecção recente e pelo paciente não residir anteriormente em área endêmica. É também comum a IDRM apresentar

positividade em indivíduos de áreas endêmicas devido a ocorrência de infecções subclínicas. Além disso, a IDRМ não distingue entre infecção passada e recente (VEGA-LÓPEZ, 2003).

A IFI apresentou resultado positivo em 71,4% dos pacientes. Resultado similar foi encontrado por Oliveira-Neto *et al.* (2000) no Rio de Janeiro. Essa técnica sorológica é incapaz de diferenciar o estágio da infecção e ainda podem apresentar reações cruzadas com outros tripanosomatídeos (ROCHA *et al.*, 2002; 2006).

A PCR foi positiva em 92,3% das biópsias analisadas, mostrando ser essa a técnica que oferece as melhores taxas de sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar baixa quantidade de parasitos na infecção. Resultados similares também foram encontrados por outros autores (FABER *et al.*, 2003; MENDONÇA *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2002).

Nos 15 pacientes avaliados, a pesquisa direta apresentou 53% de positividade. Esse teste parasitológico não é capaz de determinar a espécie do parasito, visto que todas as espécies de *Leishmania* são morfologicamente idênticas (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; VEGA-LÓPEZ, 2003).

Os isolados do parasito, obtidos do cultivo *in vitro* de promastigotas, foram analisados por anticorpos monoclonais e identificados como *L. (V.) braziliensis*. As sete amostras isoladas são de grande representatividade devido às dificuldades existentes no cultivo dessa espécie de *Leishmania* (BENSOUSSAN *et al.*, 2006). Estudos anteriores em PE também identificaram, através da técnica de anticorpos monoclonais e por isoenzimas, essa espécie do parasito (ANDRADE *et al.*, 2005; BRANDÃO-FILHO, 2001; BRITO *et al.*, 1993). Esses dados confirmam que, até o momento, a única espécie de *Leishmania* circulante e responsável pela LTA em PE é a *L. (V.) braziliensis*.

A identificação da espécie do parasito envolvido nos casos da doença no homem em uma área endêmica é essencial para o entendimento dos aspectos clínicos e epidemiológicos, sobretudo para o diagnóstico e para o desenvolvimento da terapia e prognóstico da doença (CARVALHO *et al.*, 2006).

O tratamento da LTA apresenta limitações como a toxicidade das drogas disponíveis e a ausência de um critério de cura objetivo. O tratamento quimioterápico é baseado primariamente na administração de antimoniais pentavalentes, sendo utilizado no Brasil o Glucantime®. Estes antimoniais são caros, altamente tóxicos e administrados via intramuscular durante um prolongado período (PASSOS *et al.*,

1999). Embora a literatura descreva inúmeros efeitos colaterais, nenhuma reação adversa ao tratamento foi relatada pelos pacientes em nosso estudo.

Uma grande dificuldade para o tratamento da LTA, favorecendo a interrupção do tratamento, é a sua ocorrência em áreas rurais distantes onde existe difícil acesso ao serviço de saúde e, muitas vezes, há necessidade exclusiva de terapêutica parenteral (RODRIGUES *et al.*, 2006).

O tratamento nos pacientes foi 100% eficaz e o tempo da terapia variou de 20 a 90 dias, apresentando cicatrização completa das lesões. Após o fim do tratamento, os pacientes foram acompanhados por um período de 12 meses para, além de confirmar a cura clínica, evitar o aparecimento de novas lesões e reativação das lesões cicatrizadas (recidivas).

A boa eficácia terapêutica também já foi relatada por outros autores e essa eficácia pode estar relacionada a características do parasito e ao pouco tempo de evolução da maioria dos pacientes (PASSOS *et al.*, 2001; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1997). As lesões cutâneas causadas pela *L. (V.) braziliensis* são normalmente susceptíveis ao tratamento com antimoniais e a cicatrização ocorre no final da terapia (COUTINHO *et al.*, 2002).

Embora exista a quimioterapia, são necessários maiores estudos para estabelecer o melhor esquema terapêutico e o desenvolvimento de novos tratamentos que proporcionem melhores condições e poucos danos aos indivíduos doentes (ARMIJOS *et al.*, 2004).

O critério de cura adotado por muitos autores é a completa cicatrização da lesão. Entretanto, esse critério é insatisfatório, pois pode ocorrer a reativação das lesões mesmo após tratamento e cicatrização completa da lesão inicial. A ocorrência de mais de 90% das recidivas em até um ano na LTA reforça a sugestão de controle clínico por pelo menos um ano após o tratamento. (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003; MENDONÇA *et al.*, 2004; SCHUBACH *et al.*, 1998).

Uma característica de todas as espécies de *Leishmania* é a tendência em provocar infecções inaparentes ou a persistência do parasito após resolução da lesão (RAMÍREZ; GUEVARA, 1997). Essa persistência levanta questões a respeito da evolução clínica, da epidemiologia e das estratégias para o controle da leishmaniose (MENDONÇA *et al.*, 2004).

O “status” imunológico do hospedeiro infectado por *Leishmania* pode representar um papel importante no sucesso da quimioterapia, uma vez que infecções por este parasito estão associadas com uma imunossupressão do hospedeiro. Uma eficiente resposta imune mediada por células é necessária para a eficácia máxima do antimonial pentavalente no tratamento e a relação entre a imunossupressão induzida pelo parasito e a quimioterapia efetiva é de grande importância (BERGER; FAIRLAMB, 1992).

Em modelo experimental, a imunossupressão diminui a efetividade da terapia com antimonial pentavalente através da diminuição da produção de IFN- γ . Muitos trabalhos têm estudado a combinação da quimioterapia com a imunoquimioterapia através da estimulação de ativadores de macrófagos, como o IFN- γ . A busca de terapias alternativas e de imunoproliféricos têm sido recomendado como prioridade para as estratégias de controle da doença (ARMIJOS *et al.*, 2004; BERGER; FAIRLAMB, 1992).

Uma vez que a LTA apresenta alta endemicidade em PE e que a *L. (V.) braziliensis* é a espécie de maior incidência no país e a única circulante em PE, não há informação sobre o perfil da resposta imune celular dos pacientes desta região ao tratamento quimioterápico convencional com Glucantime®, frente a estimulação com a fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis*.

Estudos anteriores, realizados por Brito *et al.* (2001), demonstraram que esta fração, constituída por proteínas provenientes do citoplasma do parasito, promoveu resposta anticórpica em pacientes com LTA. Foi observado uma diminuição na reatividade anticórpica quando comparado soros de pacientes apresentando lesões ativas, antes e após tratamento específico. Resultado similar foi observado em indivíduos com cura espontânea. Brito *et al.* (2001) sugerem que esses antígenos poderiam ser usados como marcadores de cura.

Visto que a imunidade mediada por células T desenvolve um papel fundamental na resposta do hospedeiro ao parasito *Leishmania* e que o papel de anticorpos específicos na resposta imune não está completamente esclarecido (TRUJILLO *et al.*, 1999), faz-se necessário caracterizar a resposta imune celular de PBMC ao estímulo com este antígeno antes e após o tratamento.

Embora estudos semelhantes tenham sido realizados por outros autores, estes apenas avaliaram as respostas celulares à antígenos totais de *L. (V.)*

braziliensis (DA-CRUZ *et al.*, 2002; TELINO *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2001). Portanto, este estudo foi de fundamental importância na tentativa de contribuir para o entendimento de aspectos relacionados à evolução clínica de pacientes com LTA em PE. Essa compreensão permitirá o estudo e a identificação de novas moléculas imunogênicas do parasito potencialmente candidatas a vacinas.

Em todas as formas clínicas da LTA, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, aceita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* está relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2 (BACELLAR *et al.*, 2002; PIRMEZ *et al.*, 1993).

Os estudos imunológicos na infecção por *L. (V.) braziliensis* estavam limitados aos estudos em humanos devido a falta de um modelo experimental para essa espécie. Em 2005, Moura *et al.* estabeleceram um modelo experimental para *L. (V.) braziliensis* utilizando camundongos BALB/c que apresentaram evolução clínica semelhante ao do homem. Entretanto, a dificuldade existente no estabelecimento desse modelo experimental ainda contribui para a continuação dos estudos com pacientes (CARVALHO *et al.*, 1995; CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1990; COUTINHO *et al.*, 1996; DA-CRUZ *et al.*, 2002; FARIA *et al.*, 2005; LEOPOLDO *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 1998; TELINO *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2001).

Para analisar a resposta imune celular em relação ao tratamento quimioterápico convencional na LTA, PBMC obtidas de sangue periférico de quinze pacientes antes do tratamento quimioterápico (lesões ativas) e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico (lesões cicatrizadas) e de 10 indivíduos do grupo controle foram estimuladas *in vitro* com antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. O estímulo *in vitro* também foi realizado com os mitógenos ConA e PHA.

Todos os indivíduos apresentaram proliferação celular em resposta aos mitógenos, não havendo diferença significativa entre o grupo controle e os pacientes antes e após tratamento, mostrando que a resposta imune celular não foi suprimida. Esses mitógenos também vêm sendo utilizados por outros autores apresentando resultados similares (CARVALHO *et al.*, 1985; CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1990; COUTINHO *et al.*, 1996; MENDONÇA *et al.*, 1986; TELINO *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2001).

Analisando-se a resposta proliferativa frente ao estímulo antigênico, nenhum indivíduo do grupo controle apresentou linfoproliferação. Os pacientes, antes e após tratamento, apresentaram uma elevada resposta proliferativa. Embora a média dos

índices de estimulação tenham aumentado nos pacientes após o tratamento, não foi observada diferença significativa quando comparado antes de iniciar o tratamento. Estes resultados não foram diferentes daqueles encontrados por outros autores (COUTINHO *et al.*, 1996; 1998; DA-CRUZ *et al.*, 1994; TOLEDO *et al.*, 2001).

A persistência de uma resposta imune celular específica a antígenos de *Leishmania*, após a cura clínica, poderá contribuir para a imunoproteção da doença. Um efeito benéfico indireto do tratamento com antimonial seria um aumento da resposta imune de células T após o tratamento (MENDONÇA *et al.*, 1986).

Estudos sobre a resposta imune celular na LTA também já foram desenvolvidos por alguns autores utilizando-se outros antígenos. O estímulo de PBMC de pacientes com leishmaniose cutânea localizada com antígenos totais de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, antes do tratamento com antimonial pentavalente e no término da terapia, promoveu uma tendência ao declínio da resposta linfoproliferativa no fim da terapia, mesmo não tendo observado diferença significativa (COUTINHO *et al.*, 1996; 1998; DA-CRUZ *et al.*, 1994).

Telino *et al.* (2005) avaliaram *in vitro* a resposta de PBMC de pacientes com LTA frente a estimulação com antígenos totais de *L. (V.) braziliensis* e *L. amazonensis*, bem como frações antigênicas solúveis e insolúveis de *L. amazonensis*. Após o estímulo com esses antígenos, a resposta linfoproliferativa dos pacientes foi significativamente mais elevada quando comparada com indivíduos saudáveis. O antígeno total de *L. (V.) braziliensis* apresentou uma proliferação significativamente mais elevada em relação ao antígeno total de *L. amazonensis*. Esse resultado pode ser explicado pelo fato dos pacientes estarem infectados por *L. (V.) braziliensis*.

Em relação aos antígenos de *L. amazonensis*, a resposta linfoproliferativa foi significativamente mais elevada com o antígeno total, comparado-se com a fração antigênica solúvel. Em contrapartida, não houve diferença na resposta com a fração insolúvel. A fração insolúvel apresentou uma antigenicidade mais elevada que a fração solúvel, sugerindo que as proteínas presentes nessa fração insolúvel seriam mais antigênicas que o antígeno total. Contudo, pouco se sabe a respeito da antigenicidade entre as frações solúveis e insolúveis de promastigotas de *Leishmania* (TELINO *et al.*, 2005).

Em busca de alternativas para o tratamento, Toledo *et al.* (2001) avaliaram a resposta imune em pacientes com LTA tratados com antimonial pentavalente

(Glucantime®) e em pacientes tratados com imunoquimioterapia. Enquanto o tratamento com Glucantime® corresponde a quimioterapia convencional, a imunoquimioterapia é a associação de uma vacina composta por cinco diferentes cepas de *Leishmania* (Leishvacin®) com o antimonial. PBMC de pacientes tratados com a quimioterapia, estimuladas com antígeno total de *L. (V.) braziliensis*, apresentaram uma diminuição na resposta proliferativa ao término da terapia, comparado-se com pacientes tratados com a imunoquimioterapia. Neste caso, não foi observada diferença significativa em relação a proliferação antes e após o tratamento.

Portanto, pacientes tratados com imunoquimioterapia apresentaram uma resposta linfoproliferativa persistente durante o tratamento. Essa diferença na resposta é provavelmente relacionada com a presença *in vivo* do antígeno durante o tratamento. Em relação aos pacientes tratados com Glucantime®, é esperado que *in vivo*, a estimulação de células T diminua durante o progresso do tratamento para a cura. Isso ocorrerá desde que a redução na carga parasitária possa provavelmente causar a diminuição do número de células T responsivas (TOLEDO *et al.*, 2001).

Na imunoquimioterapia, entretanto, a contínua inoculação do antígeno possivelmente faz com que, *in vivo*, essas células continuem sendo estimuladas. Essa estimulação persiste, mesmo na diminuição da carga parasitária. Assim, pacientes tratados com imunoquimioterapia apresentam *in vitro* uma resposta linfoproliferativa inalterada no final do tratamento (TOLEDO *et al.*, 2001).

O mecanismo imune envolvido no processo de cura é, ao que tudo indica, diferente em cada tratamento. Essa afirmação decorre pelo fato de células de pacientes tratados pela imunoquimioterapia produzirem, significativamente, menos IFN- γ *in vitro* do que pacientes tratados com a quimioterapia convencional (TOLEDO *et al.*, 2001).

A capacidade do sistema imune em responder a uma infecção secundária mais rápida e melhor, comparando-se a uma primeira infecção, é de responsabilidade da memória imunológica do hospedeiro. Este é o objetivo das vacinas nas doenças infecciosas. A leishmaniose induz uma excelente proteção contra uma segunda exposição; apesar disso, uma vacina efetiva contra essa doença ainda não existe. Esse fato indica a necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença, sobretudo na

memória imunológica para auxiliar no processo de criação das vacinas (SCOTT, 2005).

Uma importante característica da infecção por *Leishmania* é a ocorrência de persistência parasitária, após a cura clínica, levando a produção de uma resposta imune protetora e resistência a re-infecção. Essa resposta protetora é formada pelas células T efetoras e células T de memória que são divididas em células T de memória central (T_{cm}) e células T de memória efetora (T_{em}). As T_{cm}, independentes da presença do parasito, migram para os linfonodos. Já as T_{em} são dependentes da presença do parasito, secretam citocinas e possuem a capacidade de migrarem para os tecidos (SCOTT *et al.*, 2004; 2005).

Zaph *et al.* (2004) demonstraram, em camundongos, que apesar das células T CD4⁺ efetoras serem perdidas na ausência dos parasitos, as células T CD4⁺ de memória central são mantidas. Em uma re-infecção, essas células T de memória central se tornam células T efetoras e conferem proteção. Porém, ainda não está claro como as T_{cm} são desenvolvidas e conservadas. Questões em relação a essas células permanecem e maiores investigações são necessárias, de modo a contribuir para o desenvolvimento de vacinas contra *Leishmania* (GOLLOB *et al.*, 2005). Embora infecções por *Leishmania* induzem intensa resposta imune celular, os parasitos não são totalmente eliminados.

Recentes estudos indicam que, durante a infecção, a geração de células T regulatórias limitam a ação do sistema imune suficientemente para manter a persistência do parasito. Essas células exercem sua função regulatória em parte pela produção de IL-10. Camundongos *knock-out* para IL-10 infectados com uma baixa dose de parasitos desenvolveram uma resposta imune aumentada com a eliminação total dos parasitos. Interessantemente, esses camundongos perderam a imunidade à re-infecção, sugerindo que a persistência parasitária é necessária para manter a imunidade (BELKAID *et al.*, 2002).

A resposta imune celular ao parasito *Leishmania* ocorre com a produção de citocinas que são importantes para o desenvolvimento e controle da resposta imune (ANTONELLI *et al.*, 2004).

Na leishmaniose humana, o papel da resposta imune celular do tipo Th1 tem sido associado ao controle da infecção. O evento crucial para indução da resposta imune curativa contra a *Leishmania* é a eficiente ativação de células capazes de produzir citocinas protetoras que levam à ativação de macrófagos via IFN- γ . Isso

resulta na síntese de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativo e, conseqüentemente, na morte dos parasitos intracelulares. Embora a resposta Th1 seja benéfica, o controle da resposta inflamatória através da produção de IL-10 é essencial para a cura da doença (ANTONELLI *et al.*, 2004; SALAIZO-SUAZO *et al.*, 1999; SCOTT *et al.*, 2004).

Como parte da caracterização da resposta imune na LTA, em nosso estudo também foi analisada a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 em sobrenadantes de culturas de PBMC antes e após o tratamento, utilizando os mesmos estímulos utilizados na avaliação da resposta de proliferação celular.

Avaliando-se a produção de IFN- γ e IL-10, frente aos mitógenos, observou-se diferenças significativas entre os grupos. A ConA e a PHA são mitógenos policlonais que têm sido amplamente utilizados em estudos *in vitro* de ativação de células. Induzem mitose por um mecanismo que é dependente de TCR e nem todas as células T sofrem esse processo (PAUL, 1999). Assim, as diferenças estatísticas encontradas na produção das citocinas podem ser explicadas por esse fato, ou seja, os mitógenos não estimularam a mitose igualmente nesses grupos.

A análise dos níveis das citocinas IFN- γ e IL-10 nesse estudo, após estimulação com o antígeno, apresentou resultados superiores nos pacientes do que no grupo controle. As PBMC do grupo controle produziram estas citocinas em quantidades mínimas, comparado-se com as médias dos pacientes com LTA.

Em relação à produção de IFN- γ , observou-se uma diminuição após o término do tratamento em relação a média dos pacientes antes do tratamento. Embora evidenciada, não foi encontrada diferença significativa. Já os níveis de IL-10 apresentaram resultados inversos. Nos pacientes avaliados, a produção dessa citocina foi mais elevada após tratamento, embora também não tenha sido constatada diferença significativa.

A existência de mecanismos de imunorregulação, necessários para promover uma resposta Th1 efetiva na LTA, pode explicar nossos resultados. Esses mecanismos são importantes para manter a integridade tecidual do hospedeiro contra uma subseqüente resposta inflamatória. Recentes estudos demonstraram que a resposta Th1, formada após infecção por *L. (V.) braziliensis*, é acompanhada pela resposta de células T produtoras de IL-10 (ANTONELLI *et al.*, 2004).

Citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12 podem ser tóxicas quando produzidas em quantidades elevadas e a IL-10 bloqueia a ativação de células Th1. Conseqüentemente, previne a superprodução dessas citocinas, evitando dano tecidual (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998). A IL-10 também inibe a ativação macrofágica, como a expressão de moléculas co-estimulatórias como B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) e moléculas de adesão intercelular, diminuindo a habilidade dessas células em destruir a *Leishmania* (DING *et al.*, 1993; BOURREAU *et al.*, 2001).

Pompeu *et al.* (2001) identificaram que a produção de IFN- γ é proporcional à produção de TNF- α e IL-10. Usualmente, a IL-10 exibe propriedades para desativar macrófagos em humanos.

Em nosso estudo, a produção de IL-10 aumentada após o tratamento pode sugerir a ação de células T regulatórias que utilizam essa citocina para limitar a ação do sistema imune, favorecendo a persistência do parasito após cura clínica (BELKAID *et al.*, 2002).

O perfil de citocinas encontrado nas lesões ativas de pacientes com LTA tem sido demonstrado como uma mistura de citocinas do tipo 1 e 2, predominando mRNA para citocinas do tipo 1 (PIRMEZ *et al.*, 1993). Células de pacientes com lesões crônicas produzem mais IFN- γ do que pacientes com lesões recentes. Esse fato está provavelmente relacionado com o elevado número de células T produtoras de IFN- γ que infiltram nas lesões (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; TOLEDO *et al.*, 2001).

Estudos anteriores avaliando a produção de IFN- γ em sobrenadantes de cultura de PBMC de pacientes com lesões cutâneas localizadas, estimuladas com antígenos totais de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, demonstraram um aumento nos níveis dessa citocina logo após o término da terapia com Glucantime®. Apesar desse aumento, não foi constatada diferença significativa antes e após o tratamento. Esse aumento está provavelmente relacionado com o aumento da expressão de células CD8+ produtoras de IFN- γ (COUTINHO *et al.*, 1996; 1998; DA-CRUZ *et al.*, 1994; TOLEDO *et al.* 2001).

Toledo *et al.* (2001) analisando a produção de IFN- γ , antes do tratamento, observaram que sobrenadantes de cultura de pacientes tratados com imunoquimioterapia apresentaram uma diminuição na produção de IFN- γ ao final do tratamento quando comparado aos valores antes do tratamento. Uma significativa

diminuição na produção de IL-10 pôde ser observada após o termino do tratamento com Glucantime® e com a imunoquimioterapia. A diminuição da produção de IL-10 provavelmente permite uma ação mais eficiente do IFN- γ , levando à cicatrização das lesões.

Telino *et al.* (2005) demonstraram que o antígeno total de *L. (V.) braziliensis* provoca uma alta resposta proliferativa e produz elevados níveis de IFN- γ . O mesmo não ocorre com IL-10, quando comparado com antígenos de *L. amazonensis* em culturas de PBMC de pacientes com LTA. Entretanto, esses pacientes estavam infectados com *L. (V.) braziliensis*. É esperado que as células T de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* respondam mais fortemente a antígenos provenientes de espécies homólogas do que a antígenos provenientes de espécies de diferente subgênero. Resultados semelhantes foram encontrados por Silveira *et al.* (1998) que mostraram que o antígeno de *L. (V.) braziliensis* é um potente estimulador da resposta de células T em relação ao antígeno de *L. amazonensis*.

As diferenças nos resultados que obtivemos poderiam estar associadas com o antígeno utilizado, mostrando diferenças na antigenicidade em estimular as células T de memória. Estudos com a resposta de células T a antígenos totais são tão importantes quanto o estudo da resposta de células T a peptídeos e/ou epítomos derivados de antígenos de *Leishmania* (DA-CRUZ *et al.*, 1994). A finalidade dos estudos sobre a resposta imune celular traz contribuições para a busca de novos antígenos candidatos a vacinas e para o desenvolvimento de modelos para o parasito.

Além disso, esses resultados também podem ser influenciados pelo tempo utilizado como critério para cura clínica. Em nosso trabalho, a avaliação foi feita um ano após o término do tratamento. Nos outros estudos, as avaliações foram realizadas logo após o fim da terapia, embora todos os indivíduos estudados apresentaram lesões cicatrizadas.

Apesar da importância da resposta Th1 na cura da infecção, vale ressaltar que as mesmas citocinas envolvidas no controle da infecção podem estar relacionadas com a patogênese da doença. Parece ser necessário a existência de um contrabalanço com as células produtoras de citocinas do tipo Th2, ou seja, uma dicotomia Th1 x Th2 (REIS *et al.*, 2006).

Assim, as células T CD4+ e CD8+ atuam como fonte de produção de citocinas envolvidas no processo de ativação de macrófagos. A produção inicial de IFN- γ por células “natural killer” (NK) pode ser importante na diferenciação das células T CD4+ nas respostas Th1 e Th2 (PINHEIRO, 2004).

As células T auxiliares (CD4+) induzem efeitos opostos associados com cura ou agravamento da doença, dependendo do perfil de citocinas produzidas. Já as células T citotóxicas (CD8+) também parecem desenvolver um papel importante no processo de cura na leishmaniose experimental, pela modulação da atividade de células T CD4+ ou possivelmente via efeito citolítico direto em macrófagos infectados. Em resposta ao estímulo com antígenos de *Leishmania*, essas células proliferam em números significativos (DA-CRUZ *et al.*, 1994).

Foi constatado que as células T CD4+ proliferaram em maior frequência que as células T CD8+ antes do tratamento quimioterápico, sendo encontrada situação semelhante em indivíduos sadios. Ao final da terapia, observou-se um aumento da população de células T CD8+ e um declínio na população de células CD4+, sugerindo uma maior participação das células T citotóxicas nos processos de cura (DA-CRUZ *et al.*, 1994; SCOTT *et al.*, 2004).

Além disso, a determinação da resposta do tipo Th1 e Th2 também pode ser influenciada pelo tipo de cepa e a dose inoculada do parasito, pelo sítio de inoculação, pela saliva de algumas espécies de flebótomos, além dos aspectos imunológicos e predisposição genética do hospedeiro (ROGERS *et al.*, 2002).

Visando caracterizar e compreender de forma mais completa a resposta imune na LTA em Pernambuco, trabalhos futuros serão desenvolvidos abordando a caracterização fenotípica das PBMC responsivas às frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*, através da citometria de fluxo, realização de dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura, além da realização de RT-PCR. Tais análises serão feitas não só para verificar a influência do tratamento, mas também para avaliar a resposta de pacientes curados espontaneamente.

Como a maioria dos estudos envolvendo a resposta imune na leishmaniose utiliza espécies do Velho Mundo, principalmente a *L. major*, a investigação trouxe maiores esclarecimentos a respeito dos aspectos imunológicos envolvidos na infecção por *L. (V.) braziliensis* em nossa região.

Os resultados obtidos neste estudo e nos próximos a serem realizados poderão contribuir para a busca de novas moléculas antigênicas capazes de induzir

uma resposta imune protetora, podendo ser utilizadas no futuro no desenvolvimento de vacinas, como também no diagnóstico e na quimioterapia.

8 CONCLUSÃO

1) Os isolados do parasito, obtidos do cultivo *in vitro* de promastigotas, confirmam que *L. (V.) braziliensis* é a única espécie até o momento responsável pela LTA em PE. Esta identificação é essencial para entender os aspectos clínicos e epidemiológicos, sobretudo para o diagnóstico e para o desenvolvimento de terapia e prevenção desta doença.

2) Considerando que a persistência parasitária, após a cura clínica, é uma importante característica da infecção por *Leishmania* e pode induzir uma resposta imunológica protetora e resistente a re-infecção, pode-se concluir que há resposta proliferativa específica de PBMC de pacientes com LTA antes e após tratamento quimioterápico frente a fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis*.

3) A produção de IFN- γ e IL-10, antes e após tratamento quimioterápico, indica que os pacientes produziram uma resposta celular específica, sugerindo que mecanismos de regulação imunológica com a participação de células T de memória e células T regulatórias, além da dicotomia Th1 x Th2 estão presentes na evolução clínica desses indivíduos.

REFERÊNCIAS

AEBISCHER, T. Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites? **Parasitology Today**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 25-28, Jan. 1994.

AKOPYANTS, N. S., *et al.* Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Saint Louis, v. 136, p. 71-86, 2004.

AMATO, V. S., ANDRADE Jr, H. F., DUARTE, M. I. S. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 85, p. 39-49, Jan. 2003.

ANDRADE, M. S., *et al.* Sandfly fauna in a military training área endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1761-1767, Nov/Dez. 2005.

ANTONELLI, L. R., *et al.* Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical Experimental Immunology**, Oxford, v. 136, p. 341-348, May. 2004.

ARMIJOS, R. X., *et al.* Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 91, p. 153-160, Jul. 2004

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 1269-1284, Nov. 2000.

BACELLAR, O., *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, Dec. 2002.

BALANCO, J. M., *et al.* Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitology**, London, v. 116, p. 103-113, Feb. 1998.

BELKAID, Y., *et al.* CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, London, v. 420, p. 502-507, Dec. 2002.

BENSOUSSAN, E., *et al.* Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 1435–1439, Apr. 2006.

BERGER, B. J., FAIRLAMB, A. H. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. **Parasitology**, London, v. 105, p. S71-S78, 1992.

BOGDAN, C., *et al.* Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 8, p. 517-525, Aug. 1996.

BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.28, n.1, p.121-134, Jan. 1998.

BOMFIM, G., *et al.* A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic responses in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 84, p. 188-194, Nov. 1996.

BOURREAU, E., *et al.* High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 184, p. 1628-1630, Dec. 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72: 248-254, 1976.

BRANDÃO-FILHO, S. P., *et al.* Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 291-6, 2003.

BRANDÃO-FILHO, S. P. Eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada a *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2001.

BRANDÃO-FILHO, S. P., *et al.* Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of The Royal Medicine Hygiene**, London, v. 93, p. 488-494, Sep/Oct. 1999.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Relatório de Situação: Pernambuco**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia**. 3. ed. Brasília, 2004. Série A Normas e Manuais Técnicos.

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

BRITO, M. E. F., *et al.* Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* occurring in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, p. 633-634, Oct. 1993.

BRITO, M. E. F., *et al.* Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 7, n. 2, p. 318-321, Mar. 2000.

CÁCERES-DITTMAR, G., *et al.* Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. **Clinical Experimental Immunology**, Oxford, v. 91, p. 500-505, Mar. 1993.

CARRERA, L., *et al.* *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 183, p. 515-526, Feb. 1996.

CARVALHO, E. M., *et al.* Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, New York, v. 135, n. 6, p. 4144-4148, Dec. 1985.

CARVALHO, M. L. R., *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 98, p. 277-285, 2006.

CARVALHO, E. M., *et al.* Characterization of the immune response in subjects with self healing cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 53, n. 3, p. 273-277, Sep. 1995.

CARVALHO, E. M., *et al.* Clinical and disseminated immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 56, p. 315-325, Apr. 1994.

CARVALHO, M. L. R. Aspectos da imunidade celular em pacientes com leishmaniose tegumentar americana, procedentes de área endêmica do Estado de Mato Grosso – Brasil, antes e após o tratamento com antimônio pentavalente. [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Belo Horizonte; 2000.

COLER, R. N., REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **TRENDS in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 244-249, May. 2005.

CONCEIÇÃO-SILVA, F., *et al.* Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 79, p. 221-226, Feb. 1990.

COSTA, J. M. L., *et al.* Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças e adolescentes procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 279-288, 1998.

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

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

COUTINHO, S. G., PIRMEZ, C., DA-CRUZ, A. M. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, S1, p. 173-178, Apr. 2002.

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

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

DE BRUIJN, M. H. L.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 52, p. 45-58, 1992.

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

DING, L., *et al.* IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **The Journal of Immunology**, New York, v. 151, n. 3, p. 1224-1234, Aug. 1993.

FABER, W., *et al.* Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy Dermatology**, St. Louis, v. 49, n. 1, p. 70-74, Jul. 2003.

FARIA, D. R., *et al.* Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington v. 73, n.12, p. 7853-7859, Dec. 2005.

FOLLADOR, I., *et al.* Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 497-503, Set/Out. 1999.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Brasília: Ministério da Saúde, v. 2, 5. ed., 16p., 2002.

GARCIA, A. L., *et al.* American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 109-116, Mar. 2005.

GAZZINELLI, G., *et al.* Immune responses during human *Schistosomiasis mansoni*. VIII. Differential in vitro cellular responsiveness to adult worm and schistosomular tegumental preparations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 32, p. 326-33, 1983.

GILLESPIE, R. D., MBOW, M. L., TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 22, p. 319-331, Jul. 2000.

GOLLOB, K. J., ANTONELLI, L. R. V., DUTRA, W. O. Insights into CD4+ memory T cells following *Leishmania* infection. **TRENDS in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 8, p. 347-350, Aug. 2005.

GONTIJO, C. M., *et al.* Concurrent cutaneous, visceral and ocular leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a kidney transplant patient. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 751-753, Jul. 2002.

GONTIJO, C. M. F., *et al.* Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 81, p. 143-150, Feb. 2002.

GONTIJO, B., CARVALHO, M. L. R. Leishmanose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p.71-80, Jan/Feb. 2003.

GRAMICCIA, M., GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, Oct. 2005.

GRIMALDI JR., G., TESH, R. B. – Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 6, n. 3, p. 230-250, Jul. 1993.

HABERER, J. E., *et al.* *Leishmania pifanoi* amastigote antigen p-4: epitopes involved in t-cell responsiveness in human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3100-3105, Jul. 1998.

HIMMELRICH, H., *et al.* In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. **The Journal of Immunology**, New York, v. 164, p. 4819-4825, Jun. 2000.

HOARE, C. A., WALLACE, F. C. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. **Nature**, London, v. 212, p. 1358-1996, 1966.

HOLZMULLER, P., BRAS-GONÇALVES, R., LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, London, v. 132, p. S19-S32, 2006.

HOWARD, J. G., HALE, C., CHAN-LIEW, W. L. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. Immunogenetic aspects of a susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 2, p. 303-314, 1980.

JUNQUEIRA-PEDRAS, M., *et al.* Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 47, p. 477-485, Nov. 2003.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes and infection**, Paris, v. 2, p. 1765-1773, Nov. 2000.

KANE, M. M., MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, New York, v. 166, p. 1141-1147, Jan. 2001.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.

KEMP, K., *et al.* Interferon-gamma- and tumour necrosis factor-alpha-producing cells in humans WORLD HEALTH ORGANIZATION are immune to cutaneous leishmaniasis. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 655-659, Jun. 1999.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAINSON, R., SHAW, J. J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In Collier L, Balows A. & Sussman M. (Eds). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Disease**, 9 ed., Arnold, London, v.5, c.13, p.241-266, 1998.

LAINSON, R., SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters WJ, Killick-Kendrick (Eds). The leishmaniasis in Biology and Medicine. **Academic Press**, London. p. 1-120, 1987.

LEOPOLDO, P. T. G., *et al.* Differential effects of antigens from *Leishmania braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on *in vitro* cytokine production. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 6, n. 75, p. 1-6, Apr. 2006.

LIMA, H. C., DEKREY, G. K., TITUS, R. G. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p.71-76, Jan/Feb. 1999.

LOUZIR, H., *et al.* Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 177, n. 6, p. 1687-1695, Jun. 1998.

MACHADO-PINTO, J., *et al.* Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. **International Journal of Dermatology**, Lewiston, v. 41, n. 2, p. 73-78, Feb. 2002.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escornel, 1911) **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 80, p. 859-876, 1986.

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

MAYRINK, W., *et al.* A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 73, p. 385-387, 1979.

MAYRINK, W., *et al.* Immunotherapy as a treatment of American cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. **Parasitologia**, Roma, v. 3, p. 159-165, Dec. 1992.

MAYRINK, W., *et al.* Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 14-21, Jan/Feb. 2006.

MAYRINK, W., *et al.* Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of *Leishmania*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, p. 125-132, Mar/Apr. 2002.

MEDEIROS, A. C., RODRIGUES, S. S., ROSELINO, A. M. F. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 421-424, Apr. 2002.

MENDONÇA, S. C., *et al.* Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 64, n. 2, p.269-276, May. 1986.

MENDONÇA, M. G., *et al.* Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, Mar. 2004.

MOURA, T. R., *et al.* Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, Sep. 2005.

OLIVEIRA, C. I., *et al.* Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Infectious Diseases**, Chicago, v. 37, n. 11, p. 149-153, Dec. 2003.

OLIVEIRA-NETO, M. P., *et al.* American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. **International Journal Dermatology**, Lewiston, v. 39, n. 7, p. 506-514, 2000.

OLIVEIRA-NETO, M. P., *et al.* A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 57, n. 6, p. 651-655, Dec. 1997.

OUELLETTE, M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 6, n.11, p. 874-882, Nov. 2001.

PASSOS, V. M. A., *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 251-258, Apr. 1999.

PASSOS, V. M. A., *et al.* Leishmaniose tegumentar na Região Metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 1, p. 5-12, Jan/Fev, 2001.

PAUL, W. E. T-lymphocyte differentiation and biology. In:_____. **Fundamental Immunology**. 4^a ed. Lippincott-Raven, p.367-409, 1999.

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 79-82, 2004.

PIRMEZ, C., *et al.* Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 91, n. 3, p. 1390-1395, Apr. 1993.

POMPEU, M. M., *et al.* Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. **Infectious and Immunity**, Washington, v. 69, n. 12, p.7453-7460, Dec. 2001.

RAMÍREZ, J. L., GUEVARA, P. Persistent infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 3, p. 333-338, May/Jun. 1997.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G – binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 116, n. 1, p. 53-64, Sep. 1981.

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

REY, L. O complexo *Leishmania braziliensis* e a leishmaniose tegumentar americana. In: _____ **Parasitologia**. 3^a Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.182-192, 2001.

RIBEIRO-DE-JESUS, A., *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 143-148, Jan. 1998.

ROCHA, R. D. R., *et al.* Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa de leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 551-562, Nov/Dec. 2002.

ROCHA, R. D. R., *et al.* Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.11, n. 2, p. 156-166, Feb. 2006.

RODRIGUES, E. H. G., *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.40, n.10, p. 3572-3576, Oct. 2002.

RODRIGUES, A. M., *et al.* Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de melgumina. **Revista da Sociedade**

Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 139-145, Mar/Apr. 2006.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I., *et al.* Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 112, n. 1, p. 44-51, Jan. 2006.

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

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

SACKS, D., SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, New York, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, Nov. 2002.

SALAZO-SUAZO, N., *et al.* Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. **Tropical medicine and International Health**, Oxford, v. 4, n. 12, p. 801-811, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHARTON, T. M., SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon- γ that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 178, n. 2, p. 567-577, Aug. 1993.

SCHUBACH, A., *et al.* Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 178, n. 3, p. 911-914, Sep. 1998.

SCOTT, P., *et al.* The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 201, p. 318-338, Oct. 2004.

SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 12, p. 1707-1713, Dec. 2005.

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

SHAW, J. J., ISHIKAWA, E. A., LAINSON, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluoresceinlabeled avidin. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicina Hygiene**, London, v. 83, n. 6, p. 783-784, Nov/Dec.1989.

SILVEIRA, F. T., *et al.* T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 19-26, Jan. 1998.

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

SOUZA, M. A. *et al.* Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 137-141, Mar/Apr. 2005.

STOLF, H. O., *et al.* Outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Itaporanga, Sao Paulo (Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 437-442, Sep/Oct. 1993.

TELINO, E., *et al.* *In vitro* responses of human peripheral blood mononuclear cells to WORLD HEALTH ORGANIZATIONle-cell, particulate and soluble extracts of *Leishmania* promastigotes. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 143, n. 2, p. 338-344, Feb. 2005.

TOLEDO, V. P. C. P. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 1, p. 89-98, Jan. 2001.

TRUJILLO, C., *et al.* The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 203-209, Dec. 1999.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Hagerstown, v. 16, n. 2, p. 97-101, Apr. 2003.

VIEIRA, M. G., *et al.* B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 979-83, Oct. 2002.

WANG, Z. E., *et al.* CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon- γ -deficient mice infected with *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 179, n. 4, p. 1367-1371, Apr. 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geographical distribution. 2003. Disponível em: <www.WORLD_HEALTH_ORGANIZATION.int/emc/diseases/leish/leishgeo1.html>. Acessado em: 7 Ago. 2006.

YARDLEY, V., *et al.* American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 194, n. 8, p. 1168-1175, Oct. 2006.

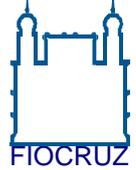
ZAMBRANO-VILLA, S., *et al.* How protozoan parasites evade the immune response. **TRENDS in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 272-278, Jun. 2002.

ZAPH, C., *et al.* Central memory T cells mediate long term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nature Medicine**, New York, v. 10, p. 1104-1110, Oct. 2004.



Centro de Pesquisas

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



AGGEU

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Caracterização da resposta imune celular em portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana antes e após tratamento quimioterápico, utilizando-se a fração antigênica solúvel de *Leishmania braziliensis*”.

Eu,, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal do referido projeto é a investigação da resposta imunológica dos pacientes com leishmaniose tegumentar ativa antes e após tratamento quimioterápico, estando ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com a equipe.

Serei submetido a coleta de sangue venoso antes e após tratamento quimioterápico e a exames que incluirão a pesquisa direta; punção aspirativa e biópsia da borda da lesão ativa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos, podendo ser considerado isento de riscos.

Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se as citocinas avaliadas, IFN- γ e IL-4 poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica.

Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecido por um participante do projeto.

Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a utilização das informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade. Autorizo, também que o CPqAM/FIOCRUZ poderá estocar amostra biológica para posteriores estudos.

 Assinatura do paciente

 data

 Assinatura da testemunha

 data

 Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

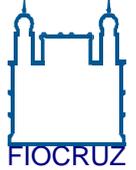
 data

Endereço profissional: Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Moraes Rêgo, s/nº, Recife, fone: (81) 34215003.



Centro de Pesquisas

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



AGGEU

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Caracterização da resposta imune celular em portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana antes e após tratamento quimioterápico, utilizando-se a fração antigênica solúvel de *Leishmania braziliensis*”.

Eu, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Embora faça parte do grupo controle, fui informado que o objetivo principal do referido projeto é a investigação da resposta imunológica dos pacientes com leishmaniose tegumentar ativa antes e após tratamento quimioterápico, estando ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com a equipe.

Serei submetido a coleta de sangue venoso. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos, podendo ser considerado isento de riscos.

Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se as citocinas avaliadas, IFN- γ e IL-4 poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica.

Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecido por um participante do projeto.

Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a utilização das informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade. Autorizo, também que o CPqAM/FIOCRUZ poderá estocar amostra biológica para posteriores estudos.

 Assinatura do paciente

 data

 Assinatura da testemunha

 data

 Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

 data

Endereço profissional: Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Moraes Rêgo, s/nº, Recife, fone: (81) 34215003.

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO

MECANISMOS IMUNOLÓGICOS

NA RESPOSTA CELULAR E HUMORAL

NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Luiza de Campos Reis, Maria Edileuza Felinto de Brito, Marina de Assis Souza e Valéria Rêgo Alves Pereira

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença antroponótica, causada por diferentes espécies de *Leishmania*, cujas manifestações clínicas variam de lesões cutâneas, que tendem para a cura espontânea, até graves lesões mucocutâneas mutilantes. As infecções por *Leishmania* podem levar a uma resposta imunológica específica por parte do hospedeiro, caracterizada pelo aumento de células T CD4⁺ e um perfil de citocinas Th1 ou Th2. Infecções por *L. major*, que é o modelo mais bem estudado, quando ocorrem em camundongos resistentes (como C57BL/6, CBA, C3H) estão associadas a uma resposta Th1, enquanto em camundongos susceptíveis (BALB/c) vinculam-se à resposta do tipo Th2. A resposta imune em humanos não é bem caracterizada como o é em camundongos e envolve o papel das citocinas, das moléculas co-estimulatórias e da saliva do flebótomo. Paralelamente à existência de uma resposta imunológica por parte do hospedeiro, a sobrevivência e a persistência parasitária dependem de estratégias de escape da resposta imune adaptativa.

DESCRITORES: Leishmaniose tegumentar americana. *Leishmania*. Citocinas. Resposta imune.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença antroponótica causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e/ou mucosas e cartilagens e representa um sério problema de saúde pública (WHO, 2003).

No Brasil, apresenta uma incidência de 35.000 casos notificados/ano. As espécies de *Leishmania* envolvidas na transmissão são representadas por uma espécie do subgênero *Leishmania* e cinco do subgênero *Viannia* (Marzochi, 1992; FUNASA, 2002). A transmissão da doença ocorre no ato da hematofagia pelas

1 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ.

Endereço para correspondência: Dra. Valéria Pereira. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil. Fax: 55 (81) 3453-2449 e 55 (81) 2101-2631. Email: valeria@cpqam.fiocruz.br

Recebido para publicação em 3/6/2005. Revisto em 9/8/2006. Aceito em 14/8/2006.

fêmeas infectadas de dípteros pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e ao gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo (WHO, 2003).

A *Leishmania* apresenta as formas promastigota e amastigota. As formas promastigotas metacíclicas são flageladas, responsáveis pela transmissão da doença e encontradas no inseto vetor, enquanto as amastigotas são encontradas no sistema fagocítico do hospedeiro vertebrado (Hoare & Wallace, 1966). As formas clínicas da LTA dependem de fatores do parasito, do vetor e de suas características epidemiológicas, além da constituição genética e imunológica do hospedeiro.

A infecção pode ser assintomática ou apresentar um espectro que varia desde lesões cutâneas localizadas ou disseminadas, forma cutânea-difusa, até graves lesões mucocutâneas (Grimaldi & Tesh, 1993). As manifestações clínicas estão geralmente associadas a uma espécie de *Leishmania*, embora algumas espécies possam causar diferentes formas clínicas (Garcia et al., 2005).

São seis as espécies encontradas no Brasil: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, responsável pela leishmaniose cutânea localizada, disseminada e mucocutânea; *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, responsáveis pela leishmaniose cutânea localizada e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsável pela leishmaniose cutânea localizada e difusa (Lainson & Shaw, 1987; Gramiccia & Gradoni, 2005).

O diagnóstico é feito pela associação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (Manson-Bahr, 1987; Kar, 1995). Infecções parasitárias podem levar a uma resposta imunológica específica por parte do hospedeiro, caracterizada pelo aumento de células T CD4⁺ e um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (Kemp, 1997; Bogdan & Rollinghoff, 1998). Paralelamente a essa resposta, a sobrevivência da *Leishmania* depende da evasão do sistema imune do hospedeiro e esse parasito é altamente adaptado ao escape dos efeitos da imunidade humoral e da imunidade celular (Sacks & Sher, 2002; Zambrano-Villa et al., 2002).

Nessa atualização, abordaremos os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta do hospedeiro, nos modelos murino e humano, ante a infecção por LTA, além das estratégias de evasão do parasito à resposta imune do hospedeiro.

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LTA EM MODELO MURINO

A infecção experimental em camundongos tem sido utilizada para examinar aspectos da relação parasito-hospedeiro na leishmaniose, como o controle genético de susceptibilidade e resistência, o papel da resposta imune mediada por células e a interação parasito-macrófago (Handman et al., 1979; Scott & Farrell, 1998).

A infecção em camundongos com promastigotas de *L. major* é o melhor modelo no estudo das doenças crônicas infecciosas que envolvem a ativação de células T CD4⁺ (Scharton & Scott, 1993; Scott & Farrel, 1998). Os camundongos

geneticamente susceptíveis desenvolvem lesões cutâneas no sítio de inoculação e falham no desenvolvimento de uma resposta imune ao parasito mediada por células; já os camundongos resistentes parecem curar-se rapidamente, graças a uma forte resposta imune celular, e mostram-se resistentes a novas reinfecções. A resistência é conferida por células Th1, enquanto a susceptibilidade é conferida por células Th2 (Locksley et al., 1987; Awasthi et al., 2004). A dicotomia Th1 X Th2 é observada nesse modelo e está associada à produção de IL-4 em camundongos susceptíveis e de IFN- γ em camundongos resistentes, no que concerne à *L. major* (Heinzel et al., 1989).

Muitas linhagens de camundongos resistentes, como C57BL/6, CBA e C3H, desenvolvem uma doença autolimitada quando infectadas com *L. major* ou *L. tropica*. Neste caso, apresentam um aumento na produção de IL-12, que ativa células NK, e células T CD4⁺ e CD8⁺ para produzirem IFN- γ , necessário para o desenvolvimento da resposta Th1 (Howard et al., 1980; Rogers et al., 2002).

Linhagens susceptíveis, como BALB/c, apresentam uma doença progressiva e severa, com um aumento na expressão de mRNA para IL-4 e na produção de IL-5, IL-10 e IL-13 (Howard et al., 1980; Scott & Farrel, 1998; Himmelrich et al., 2000). IL-4 diminui a regulação da expressão da subunidade β dos receptores da IL-12 nas células Th1, suprimindo o desenvolvimento de IFN- γ , o que leva ao desenvolvimento da resposta Th2 (Wang et al., 1994; Carrera et al., 1996).

A IL-10 desempenha um papel fundamental na inibição da ativação macrófaga e contribui para o crescimento do parasito nas lesões, uma vez que camundongos BALB/c IL10^{-/-} mostraram-se capazes de controlar a progressão da doença durante infecção por *L. major* (Kane & Mosser, 2001). Tem sido demonstrado que células NK representam uma fonte inicial de IFN- γ , que é um importante mediador da resistência inata contra o parasito (Becker et al., 2003). Camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID), os quais têm perda das funções de células T, mas possuem células NK normais, são capazes de controlar os parasitos de *L. major*. A neutralização de IFN- γ ou depleção dessas células NK, antes da infecção, inibe a habilidade que esses animais têm para controlá-la (Laskay et al., 1993; Korbelt et al., 2004). Anticorpos anti-*Leishmania* têm sido demonstrados *in vitro* promovendo a lise dos promastigotas na presença do Complemento, o que facilita a fagocitose (Liew, 1990). Outro fator que influencia a resposta do tipo Th1 ou Th2 é a saliva de algumas espécies de flebotomos que contém substâncias que facilitam a infecção (Gillespie et al., 2000). Duas são as moléculas mais investigadas. A primeira é a Maxadilan (MAX), presente nas glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis*, que inibe as funções das células T e dos macrófagos em relação à produção de NO, H₂O₂ e à secreção de TNF- α e aumenta a secreção de prostaglandina E₂. A segunda é a Apyrase, molécula vasodilatadora mais abundante em *Phlebotomus papatasi*, que inibe as funções das células T e também a produção de citocinas Th1, aumentando a produção de IL-4 e ocasionando uma infecção exacerbada (Mbow et al., 1998; Gillespie et al., 2000).

RESPOSTA IMUNE HUMANA E SUAS FORMAS CLÍNICAS

Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* não é tão bem caracterizada como a resposta em camundongos, em virtude de sua complexidade. Esta resposta envolve o papel das citocinas, das moléculas co-estimulatórias e da saliva do flebótomo (Rogers et al., 2002).

Em todas as formas clínicas da LTA, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, aceita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* está relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2 (Pirmez et al., 1993; Bacellar et al., 2002). Pacientes que contraem a forma cutânea localizada desenvolvem uma resposta do tipo Th1 no nível das lesões. As lesões mucocutâneas, que constituem uma forma crônica associada à destruição de mucosas, caracterizam-se por uma mistura de resposta dos tipos Th1 e Th2, enquanto pacientes com a forma difusa exibem uma resposta quase exclusivamente do tipo Th2 (Cáceres-Dittmar et al., 1993; Pirmez et al., 1993).

Na leishmaniose humana, o papel da resposta imune celular do tipo Th1 tem sido associado ao controle da infecção. O evento crucial para indução da resposta imune curativa contra a *Leishmania* é a eficiente ativação de células capazes de produzir citocinas protetoras que levem à ativação de macrófagos, via IFN- γ , resultando na síntese de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativo e, conseqüentemente, na morte dos parasitos intracelulares (Salaizo-Suazo et al., 1999).

Há um consenso geral de que as células T e a imunidade mediada por células contribuem para a patogênese das diferentes formas de LTA. Embora estudos avaliem a resposta humoral na LTA, ainda não está completamente esclarecido o papel de anticorpos específicos na imunidade contra *Leishmania* (Trujillo et al., 1999; Souza et al., 2005). Nas leishmanioses cutânea e mucocutânea, a imunidade celular e a predominância de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 têm sido associadas à resposta do tipo Th1; já o perfil Th2 tem sido relacionado com a leishmaniose cutânea difusa, com presença de IgG4 (Rodriguez et al., 1996; Souza et al., 2005). Pacientes com um maior tempo de evolução da doença apresentam altos níveis de IgE e em pacientes com a forma mucocutânea, os níveis de IgA se mostram aumentados (O'Neil et al., 1993). Correlação positiva entre os níveis de IgE com o tamanho da intradermorreação e uma correlação inversa entre os níveis de IgE com o número de lesões foram observadas por Sousa-Atta et al. (2002).

A intensidade da resposta humoral parece estar relacionada com a carga parasitária e com a cronicidade da infecção. Podem ser observados altos títulos de anticorpos em todas as manifestações clínicas da LTA (Trujillo et al., 1999).

Na forma cutânea localizada, as lesões são geralmente ulceradas e apresentam poucos parasitos com tendência para a cura espontânea ou uma boa resposta ao tratamento (da-Cruz et al., 2002). Há uma forte resposta de células T, com citocinas do tipo Th1, como IFN- γ e IL-12, e uma alta frequência de células B (Louzir et al., 1998; Vieira et al., 2002).

A leishmaniose cutânea disseminada é caracterizada por várias lesões acneiformes e papulares, com parasitos raros ou ausentes, e é freqüente o envolvimento das mucosas. As respostas imunológicas são bem variadas, tanto há uma forte resposta de células T como uma ausência de imunidade celular (Carvalho et al., 1994).

Indivíduos com leishmaniose cutânea difusa apresentam múltiplos nódulos e falham em produzir uma resposta imune mediada por células durante a infecção, sendo incapazes de controlar a multiplicação parasitária e a progressão da doença em consequência da falta da expressão de mRNA para IFN- γ e da baixa expressão para IL-2. Apresentam ainda elevados títulos de anticorpos específicos contra *Leishmania* (Bomfim et al., 1996; Trujillo et al., 1999). Esses pacientes não apresentam cura, são altamente resistentes à quimioterapia e exibem uma resposta do tipo Th2, com elevados níveis de IL-4 (Cáceres-Dittmar et al., 1993; Bomfim et al., 1996).

A leishmaniose mucocutânea (LM) é caracterizada por lesões destrutivas das mucosas, principalmente boca e nariz, não ocorrendo cura espontânea. Apresenta uma elevada resposta por células T específicas, tanto Th1 como Th2, sendo direcionada para uma resposta do tipo Th1 que é mais forte quando comparada com lesões cutâneas localizadas. A resposta exacerbada do tipo Th1 está associada a uma crônica e severa destruição tecidual, em razão de uma forte resposta inflamatória, e à escassez de parasitos nas lesões (Marsden, 1986; Bacellar et al., 2002; Matos et al., 2005). Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ são produzidas, além de IL-4. Essa resposta é fracamente regulada por IL-10 e TGF- β , encontradas em níveis diminuídos, mostrando que uma resposta inadequada do tipo Th1, considerada protetora na maioria das formas dessa doença, pode levar a uma imunopatogênese exacerbada (Bacellar et al., 2002; Amato et al., 2003). A LM está também associada a elevados níveis de anticorpos circulantes, como IgG1 e, principalmente, IgG3 (Rodriguez et al., 1996; Junqueira Pedras et al., 2003). A ativação de células T é também influenciada pela co-estimulação dessas células pelas células que apresentam antígenos. A co-estimulação através da molécula CD28 nas células T resulta na eficiente ativação e proliferação de células T induzidas pelo antígeno e prolonga a sobrevivência celular e a produção de citocinas (Elloso & Scott, 1999).

Estudos sugerem que a expressão de CD40, CD80 e CD86 tem um impacto significativo na resposta imune anti-*Leishmania*. O bloqueio dessas moléculas promoverá significativa inibição na produção de IFN- γ , IL-5 e IL-12 (Brodszyn et al., 2001). Recentes estudos demonstram que a resposta Th1, formada após infecção por *L. braziliensis*, é acompanhada pela resposta de células T produtoras de IL-10 (Antonelli et al., 2004). Citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12 podem ser tóxicas quando produzidas em quantidades elevadas e a IL-10 bloqueia a ativação de células Th1 e, conseqüentemente, previne a superprodução dessas citocinas, evitando dano tecidual (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998). A IL-10 também inibe a ativação macrofágica, como a expressão de moléculas co-estimulatórias como B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) e moléculas de adesão intercelular, diminuindo a habilidade dessas células em destruir a *Leishmania* (Ding et al., 1993; Bourreau et al., 2001).

Da mesma forma como foi demonstrado em modelo murino, as células NK também são decisivas na resposta de cura e eliminação de parasitos na leishmaniose humana (Maasho et al., 1998). Dois fatos têm sido demonstrados: promastigotas de *L. donovani* e *L. aethiopica* ativam células NK humanas a secretarem IFN- γ na ausência de outras células que apresentam antígeno; a estimulação direta de TLR (receptor toll-like)-tipo 2 de células NK pelo lipofosfoglicano (LPG) de *L. major* leva a uma expressão elevada desse receptor e aumenta a produção de IFN- γ e TNF- α , sugerindo a existência de uma rota adicional independente de células acessórias na ativação de células NK na leishmaniose (Becker et al., 2003; Nylen et al., 2003; Korbelt et al., 2004).

A resposta imunológica humana também é influenciada pelas moléculas contidas na saliva dos flebótomos, como proteínas, enzimas e prostaglandinas. Além de serem anticoagulantes e vasodilatadores, atuam na supressão da resposta inflamatória e na modulação de citocinas (Gillespie et al., 2000). Segundo Coler & Reed (2005), a quimioterapia, associada à resistência a drogas e à toxicidade, enfatiza a necessidade de uma vacina eficaz contra a leishmaniose que induza uma correta resposta imune, como, por exemplo, uma resposta Th1. Os primeiros estudos foram realizados nos países asiáticos, onde foram inoculadas cepas virulentas vivas de *Leishmania* na população, prática conhecida como leishmanização, cujo objetivo seria a imunidade duradoura à reinfecção após a cura da lesão, o que tem sido eficaz na leishmaniose cutânea no Velho Mundo (Khamesipour et al., 2005).

Desde a década de 1980, têm sido realizados estudos visando obter uma conduta terapêutica alternativa para LTA (Mayrink et al. 1979, 1992, 2006). Machado-Pinto et al. (2002) associaram o antimônio com uma vacina de promastigotas mortas de *L. amazonensis* e observaram que essa imunoquimioterapia foi altamente eficaz no tratamento da LTA. Vacinas utilizando preparações antigênicas de várias espécies de *Leishmania*, com ou sem BCG como adjuvante, têm sido testadas tanto para a forma cutânea como para a visceral (Coler & Reed, 2005). Moléculas imunogênicas presentes na saliva de flebótomos também podem atuar como adjuvantes no desenvolvimento de vacinas, visto que, em modelo experimental, a pré-exposição à saliva protege contra uma infecção exacerbada causada por *L. major* e *L. amazonensis*, sugerindo que uma vacina baseada na saliva de flebótomos pode ser efetiva (Gillespie et al., 2000; Kamhawi, 2000).

Progressos também ocorreram nos estudos de novos antígenos candidatos a vacinas de segunda geração contra leishmaniose. Para uma vacina ideal, esses antígenos, como LmSTI1, TSA e LeIF, preferencialmente devem estar conservados nas diferentes espécies de *Leishmania* expressas abundantemente na superfície do parasito (Coler & Reed, 2005). Dados experimentais têm demonstrado que a combinação entre células T de memória central e de memória efetora é mais efetiva no combate às infecções (Zaph et al., 2004). Ainda permanecem alguns questionamentos em relação a essas células e maiores investigações são necessárias, de modo que contribuam para o desenvolvimento de vacinas contra *Leishmania* (Gollob et al., 2005).

Uma característica comum em infecções por *Leishmania*, após cura clínica da doença, é a persistência parasitária. Vários mecanismos imunológicos, como modulação das atividades microbicidas do hospedeiro, síntese de citocinas inibitórias, falha na ativação de células T ou isolamento do parasito dentro de células que não produzem uma resposta imune, promovem a persistência do parasito. Esse fato talvez possa ser explicado como uma garantia da transmissão e, conseqüentemente, da manutenção do ciclo do parasito (Aebischer, 1994; Mendonça et al., 2004). A demonstração dessa persistência em indivíduos curados clinicamente levanta várias questões a respeito da evolução clínica, da epidemiologia e das estratégias para o controle da leishmaniose (Mendonça et al., 2004).

ESTRATÉGIAS DE EVASÃO DO PARASITO

As infecções por *Leishmania* são caracterizadas pela habilidade que têm estes parasitos para escapar da destruição extracelular e penetrar em células fagocíticas, onde vão resistir ao seu poder antimicrobiano, persistindo mesmo na presença de resposta imune celular do hospedeiro (Bogdan et al., 1996; Cunningham, 2002; Rogers et al., 2002).

A manifestação da doença requer mecanismos que permitam a replicação do parasito no hospedeiro e sua resistência, pelo menos inicialmente, às defesas imunes inatas e adquiridas. O primeiro mecanismo de escape dos promastigotas é evitar a lise direta através do sistema Complemento, tendo a participação de glicoproteínas e açúcares da membrana do parasito, do LPG e da metaloproteínase gp63. Estes atuam por fosforilação, inativando componentes do sistema Complemento como o C3, C5 e C9, com a subseqüente inibição das vias clássicas e alternativas do Complemento. Também impedem o acesso do complexo de ataque à membrana (C5b-C9). A gp63 protege o parasito através da acelerada conversão proteolítica na superfície do parasito do C3b para C3bi que funciona como uma opsonina, facilitando a ligação com receptores do Complemento tipo 3 (CR3) nos macrófagos (Bogdan et al., 1996; Bogdan & Rollinghoff, 1998). Ao escaparem do meio extracelular, os parasitos irão penetrar nas células fagocíticas através da interação com os receptores dos macrófagos e com as moléculas da superfície do parasito (Sacks & Sher, 2002). Essa ligação pode ser direta, via parasito-macrófono, ou indireta, através de moléculas do soro associadas com moléculas do parasito e com os macrófagos. Geralmente os promastigotas são opsonizados pelos C3b e C3bi, que se fixam respectivamente nos CR1 e CR3 do macrófono. Outra molécula de superfície do parasito, a GIPL (glicoinositolfosfolípideo), ao que tudo indica tem um importante papel na ligação do parasito ao macrófono, uma vez que, em estudos anteriores, anticorpos contra essa molécula bloquearam a internalização do parasito (Bogdan & Rollinghoff, 1998). Portanto, para o estabelecimento da infecção, a *Leishmania* precisa sobreviver ao processo de fagocitose que envolve a invasão em células-alvo seguras, a inibição da formação do fagolisossomo e a remoção dos radicais hidroxilas e ânions superóxidos

através do LPG, a inibição da degradação das enzimas do fagolisossomo pela gp63, a transformação em amastigotas que são mais resistentes às enzimas óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ao pH ácido do fagolisossomo.

A *Leishmania* utiliza outros mecanismos que auxiliam nas estratégias de escape da defesa do hospedeiro. A modulação de citocinas pode ocorrer através da inibição/desativação de macrófagos, pela supressão ou perda da indução da ativação de citocinas; a inibição da apresentação de antígeno e da estimulação de células T, pela supressão, internalização e degradação de moléculas MHC II e a alteração da função/diferenciação de células T, através da indução e expansão de células do tipo Th2 (Bogdan & Rollinghoff, 1998; Cunningham, 2002; Forget, 2004). Os antígenos são processados dentro dos macrófagos e apresentados às células T CD4⁺ que determinarão uma resposta do tipo Th1 ou Th2. O tipo de cepa e a dose inoculada do parasito, o sítio de inoculação, a saliva de algumas espécies de flebotomos, aspectos imunológicos e predisposição genética do hospedeiro podem influenciar nessa resposta (Rogers et al., 2002). Também há evidências de que as formas amastigotas do parasito, opsonizadas por IgG, podem ser fagocitadas via receptor Fc dos macrófagos. Essa ligação do patógeno com receptores dos macrófagos pode alterar o perfil de citocinas secretadas, prevenindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Pleass & Woof, 2001).

Kima et al. (2000), utilizando camundongos nocaute para cadeia γ do receptor Fc, mostraram que esses animais foram refratários à infecção do parasito do complexo *L. mexicana*. Além disso, experimentos com camundongos nocaute para a citocina IFN- γ indicaram que a ligação de formas amastigotas de *Leishmania* ao Fc γ R da superfície de macrófagos, via IgG do hospedeiro, resulta na produção de altos níveis de IL-10 e, conseqüentemente, bloqueia a habilidade dos macrófagos de matar os parasitos (Kane & Mosser, 2001).

Recentes estudos sugerem que microrganismos patogênicos podem modular ou interferir no reconhecimento de padrões mediados pelos receptores toll-like (TLRs) e podem usar os TLRs como um mecanismo de escape do hospedeiro (Netea et al., 2004). Os TLRs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e isso induz à produção de sinais responsáveis pela ativação de genes importantes para uma defesa imune do hospedeiro, especialmente de citocinas pró-inflamatórias. A ausência de sinalização intracelular sobre a ligação de PAMPs com TLRs resulta no aumento da susceptibilidade a parasitos, como *L. major* (de Veer et al., 2003). Embora outros TLRs possam estar envolvidos, camundongos nocautes em TLR-tipo 4 (C3H/HeJ) são capazes de iniciar uma resposta imune inata contra antígenos de *L. braziliensis* (Borges et al., 2001).

Hawlish et al. (2005) verificaram o efeito supressor do Complemento C5a na polarização para Th1, no qual foi evidenciada, pela resistência do camundongo BALB/c nocaute para o receptor C5a, a infecção por *L. major*. Nesse modelo de estratégia de evasão, *L. major* levou à ativação do sistema Complemento por suprimir a imunidade mediada por célula induzida pelo TLR.

Um dos importantes aspectos de doenças como a leishmaniose é a imunidade concomitante, resultante do longo tempo de persistência do patógeno no hospedeiro. A persistência de *L. major* após cura, em pele de camundongos resistentes C57BL/6, é controlada por uma população de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺. Durante infecção por *L. major*, essas células acumulam-se na derme, onde suprimem, por mecanismos dependentes ou não de IL-10, a habilidade de células T efectoras CD4⁺CD25⁻ eliminarem o parasito no sítio de infecção. A imunidade obtida em camundongo com atividade prejudicada de IL-10 é seguida da perda de imunidade à reinfeção, indicando que o equilíbrio estabelecido entre células T efectoras e reguladoras nos sítios de infecção crônica podem refletir estratégias de sobrevivência do parasito e do hospedeiro (Belkaid et al., 2002). A compreensão dessa complexa interação entre hospedeiro e parasito poderá influenciar no desenvolvimento de novas estratégias de profilaxia e terapia.

ABSTRACT

Immunological mechanisms in the cellular and humoral response in the American tegumentary leishmaniasis

The American tegumentary leishmaniasis is an anthroponotic disease caused by different *Leishmania* species, whose clinical manifestations varies from benign self-healing cutaneous lesions to severe mutilating mucocutaneous lesions. *Leishmania* infections may lead to a specific immunological response by the host, characterized by the increase of T CD4⁺ cells, showing a profile of cytokine Th1 or Th2. Infections by *L. major*, the best model studied, in resistant mice (C57BL/6, CBA, C3H) are associated with a Th1 response, whereas in susceptible mice (BALB/c), with a Th2 type response. Nevertheless the immune response in humans is not as well characterized as the response in mice and it involves the role of cytokines, co-stimulatory molecules and sand flies saliva. Altogether with the existence of an immunological response by the host, the survival and the persistence of the parasites depend of escaping strategies from adaptive immune response.

KEYWORDS: American tegumentary leishmaniasis. *Leishmania*. Cytokines. Immune response.

REFERÊNCIAS

1. Aebischer T. Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites? *Parasitol Today* 10: 25-28, 1994.
2. Amato VS, Andrade Jr HF, Duarte MIS. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop* 85: 39-49, 2003.
3. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 136: 341-348, 2004.

4. Awasthi A, Mathur, RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 119: 238-258, 2004.
5. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollog KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740, 2002.
6. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 130: 65-74, 2003.
7. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach E, Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420: 502-507, 2002.
8. Bogdan C, Gessner A, Solbach W, Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol* 8: 517-525, 1996.
9. Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28: 121-134, 1998.
10. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic responses in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 84: 188-194, 1996.
11. Borges MM, Campos-Neto A, Sleath P, Grabstein KH, Morrissey PJ, Skeiky AW, Reed SG. Potent stimulation of the innate immune system by a *Leishmania braziliensis* recombinant protein. *Infect Immun* 69: 5270-5277, 2001.
12. Bourreau E, Prévot G, Gardon J, Pradinaud R, Launois P. High intralésional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. *J Infect Dis* 184: 1628-1630, 2001.
13. Brodskyn CI, Dekrey GK, Titus RG. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. *Infect Immun* 69: 665-672, 2001.
14. Cáceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sánchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 91: 500-505, 1993.
15. Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks DL. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 183: 515-526, 1996.
16. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and disseminated immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 56: 315-325, 1994.
17. Coler RN & Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21: 244-249, 2005.
18. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 72: 132-141, 2002.
19. da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG. T-Cell-Mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: Long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 251-256, 2002.
20. de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol* 33: 2822-2831, 2003.
21. Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 151: 1224-1234, 1993.
22. Elloso MM, 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.
23. Forget G. Étude des mécanismes de régulation négative utilisés par *Leishmania* pour contrer la réponse immunitaire innée. Faculté de Médecine, 2004. Disponível em: www.theses.ulaval.ca/2004/21419/21419.html. Acessado em: outubro/04.
24. Fundação Nacional de Saúde-Funasa, Ministério da Saúde-MS. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Vol.2, 5ª Ed., p.399, 2002.

25. Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya, KW, Bermudez, H, Llanos A, Arevalo J, Bañuls AL, De Doncker S, Le Ray D, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect Genet Evol* 5: 109-116, 2005.
26. Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol* 22: 319-331, 2000.
27. Gollob KJ, Antonelli LRV & Dutra WO. Insights into CD4+ memory T cells following *Leishmania* infection. *Trends Parasitol* 21: 347-350, 2005.
28. Gramiccia M & Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35: 1169-1180, 2005.
29. Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230-250, 1993.
30. Handman E, Ceredig R, Mitchell GF. Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. *Aust J Exp Biol Med Sci* 75: 9-29, 1979.
31. Hawlisch H, Belkaid Y, Baelder R, Hildeman D, Gerard C, Köhl J. C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. *Immunity* 22: 415-426, 2005.
32. Heinzl FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of IFN- γ or IL-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expression of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169: 59-72, 1989.
33. Himmelrich H, Launois P, Maillard I, Biedermann T, Tacchini-Cottier F, Locksley RM, Röcken M, Louis JA. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J Immunol* 164: 4819-4825, 2000.
34. Hoare CA, Wallace FC. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. *Nature* 212: 1358-1996, 1966.
35. Howard JG, Hale C, Chan-Liew WL. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. Immunogenetic aspects of a susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. *Parasite Immunol* 2: 303-314, 1980.
36. Junqueira Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VMA, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 477-485, 2003.
37. Kanhawi S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* 2: 1765-1773, 2000.
38. Kane MM & Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 166: 1141-1147, 2001.
39. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol* 21: 123-152, 1995.
40. Kemp M. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. *APMIS Suppl* 68:1-33, 1997.
41. Khamesipour A, Dowlati Y, Asilian A, Hashemi-Fesharki R, Javadi A, Noazin S, Modabber F. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine* 23: 3642-3648, 2005.
42. Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ, McMahon-Pratt D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 191: 1063-1067, 2000.
43. Korbel DS, Finney OC, Riley EM. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasitol* 34: 1517-1528, 2004.
44. Lainson R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters WJ, Killick-Kendrick (Eds). *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press, London. 1-120, 1987.
45. Laskay T, Röllinghoff M, Solbach W. Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur J Immunol* 23: 2237-2241, 1993.
46. Liew FY. Regulation of cell-mediated immunity in Leishmaniasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 155: 53-64, 1990.

47. Locksley RM, Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BS, Gardner KD Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Immunol* 138: 744-749, 1987.
48. Louzir H, Melby PC, Salah AB, Marrakchi H, Aoun K, Ismail RB, Dellagi K. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Dis* 177: 1687-1695, 1998.
49. Maasho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A, Akuffo H. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect Immun* 66: 2698-2704, 1998.
50. Machado-Pinto J, Pinto J, Costa CA, Genaro O, Marques MJ, Modabber F, Mayrink W. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. *Int J Dermatol* 41: 73-78, 2002.
51. Manson-Bahr PE. Diagnosis. In: *The leishmaniasis*. London, Peters W. & Killick-Kendrick R, 2: 703-728, 1987.
52. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escornel, 1911) *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 859-876, 1986.
53. Marzochi MCA. Curso-Doenças Infecto-Parasitárias. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *J Bras Med* 63: 82-104, 1992.
54. Matos DS, Azeredo-Coutinho RBG, Schubach A, Conceição-Silva F, Baptista C, Moreira JS, Mendonça SCF. Differential interferon- γ production characterizes the cytokine responses to *Leishmania* and *Mycobacterium leprae* antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy. *Clin Infect Dis* 40: 5-12, 2005.
55. Mayrink W, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Lima AO, Michalick MS, Williams P. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 385-387, 1979.
56. Mayrink W, Magalhães PA, Michalick MSM, da Costa CA, Lima AO, Melo MN, Toledo VP, Nascimento E, Dias M, Genaro O, et al. Immunotherapy as a treatment of American cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. *Parassitologia (Rome)* 34: 159-165, 1992.
57. Mayrink W, Botelho ACC, Magalhães PA, Batista SM, Lima AO, Genaro O, da Costa CA, Melo MN, Michalick MSM, Williams P, Dias M, Caiaffa WT, Nascimento E, Machado-Coelho GLL. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 14-21, 2006.
58. Mbow ML, Bleyenbergh JA, Hall LR, Titus RG. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 161: 5571-5577, 1998.
59. Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 189: 1018-1023, 2004.
60. Netea MG, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *Trends Microbiol* 12: 484-488, 2004.
61. Nylen S, Maasho K, Söderstrom K, Ilg T, Akuffo H. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol* 131: 457, 2003.
62. O'Neil CE, Labrada M, Saravia NG. *Leishmania (Viannia) panamensis* – specific IgE and IgA antibodies relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 49: 181-188, 1993.
63. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91: 1390-1395, 1993.
64. Pleass RJ & Woolf JM. Fc receptors and immunity to parasites. *Trends Parasitol* 17: 545-551, 2001.
65. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 31: 143-148, 1998.
66. Rodriguez V, Centeno M & Ulrich M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. *Parasite Immunol* 18: 341-345, 1996.

67. Rogers KA, Dekrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett* 209: 1-7, 2002.
68. Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunol* 3: 1041-1047, 2002.
69. Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo RP, Moll H, Gillitzer R, Pérez-Torres A, Pérez-Montfort R, Domínguez JD, Velasco-Castrejón O, Crippa M, Becker I. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health* 4: 801-811, 1999.
70. Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon- γ that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* 178: 567-577, 1993.
71. Scott P, Farrel JP. Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Induction and Regulation of T Cells following Infection of Mice with *Leishmania major*. *Chem Immunol* 70: 60-80, 1998.
72. Sousa-Atta MLB, Salame GS, D'Oliveira Jr A, Almeida RP, Atta AM, Carvalho EM. Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 101-104, 2002.
73. Souza MA, Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto Junior S, Ferreira MS. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 137-141, 2005.
74. Trujillo C, Ramirez R, Vélez ID, Berberich C. The humoral immune response to the kinetoplast membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and chagas disease: prevalence og IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett* 70: 203-209, 1999.
75. Vieira MG, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barnosa AA Jr, Barral-Netto M, Barral A. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 979-83, 2002.
76. Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon- γ -deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 179: 1367-1371, 1994.
77. World Health Organization (WHO). *Geographical distribution*. 2003. Disponível em: <www.who.int/emc/diseases/leish/leishgeo1.html> . Acessado em: Maio 2004.
78. Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol* 18: 272-278, 2002.
79. Zaph C, Uzonna J, Beverley SM, Scott P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med* 10: 1104-1110, 2004.

PRÓXIMOS EVENTOS NA ÁREA DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

XVI International AIDS Conference (AIDS 2006). Toronto, Canadá, 13 a 18 de agosto de 2006. Informações: info@aids2006.org

11º Congresso Mundial de Saúde Pública e 8º Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva. Rio de Janeiro, RJ, 21 a 25 de agosto de 2006. Informações: www.wfphacongress06.com

IX Simpósio Internacional sobre Control Epidemiológico de Vectores. Buenos Aires, Argentina, 29 a 30 de agosto de 2006. Informações: www.mundosano.org

14º. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e 2º Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Ribeirão Preto, SP, 3 a 6 de setembro de 2006. Informações: www.cbpv.com.br/congresso

Conferência Brasileira de HIV/AIDS e Hepatites Virais. Fortaleza, CE, 10 a 13 de setembro de 2006. Informações: www.cbah2006.com.br

X Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar. Porto Alegre, RS, 11 a 15 de setembro de 2006. Informações: E-mail: inscricoes@abev.com.br

VI Congresso da SBDST e II Congresso Brasileiro de AIDS. Santos, SP, 17 a 20 de setembro de 2006. Informações: www.dstsaopaulo.org.br

XXII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses. Uberaba, MG, de 27 a 29 de outubro de 2006. Informações: E-mail: reuniaouberaba@mednet.com.br ou dalmo@mednet.com.br

XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Campos do Jordão, SP, 11 a 15 de março de 2007. Informações: www.sbmt.org.br ou atendimento@perfectaeventos.com.br

APÊNDICE D – ARTIGO EM PREPARAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ANTES E APÓS TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

REIS L.C.¹; BRITO M.E.F.¹; SOUZA M.A.¹; MEDEIROS A.R.², SILVA C.J.³; LUNA C.F.¹ PEREIRA V.R.A.¹

1- Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- CPqAM/ FIOCRUZ; 2- Universidade de Pernambuco-UPE; 3- Núcleo de Vigilância em Saúde e Ambiente do município de Moreno-PE.

RESUMO

As infecções por *Leishmania* apresentam uma resposta imune específica por parte do hospedeiro, dependente de células T, apresentando um perfil de citocinas Th1 e Th2. Neste estudo os objetivos foram avaliar a resposta linfoproliferativa e identificar a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com LTA antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico com Glucantime® e de indivíduos saudáveis, frente a estímulos da fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis* e de Concanavalina A (ConA). Em relação ao antígeno, nenhum indivíduo do grupo controle apresentou linfoproliferação. Os pacientes apresentaram elevada resposta proliferativa antes e após tratamento, embora sem diferença estatística ao comparar esses dois momentos. A análise na produção das citocinas IFN- γ e IL-10 identificou diferença significativa ao comparar o grupo de pacientes em relação ao controle. Após tratamento quimioterápico, embora sem diferença estatística, a dosagem dos sobrenadantes dos pacientes revelou diminuição nos níveis de IFN- γ e aumento de IL-10. Estes resultados indicam que os pacientes produziram uma resposta celular específica a fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis*, sugerindo que mecanismos de regulação imunológica com a participação de células T de memória e células T regulatórias, além da dicotomia Th1 x Th2 estão presentes na evolução clínica desses indivíduos.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por protozoários digenéticos pertencentes ao gênero *Leishmania*, de transmissão vetorial, acometendo pele, mucosas e cartilagens. As formas clínicas da LTA dependem da espécie do parasito, do vetor, além das características epidemiológicas, constituição genética e condição imunológica do hospedeiro (ROGERS *et al.*, 2002).

As infecções por *Leishmania* levam a uma ativação específica da resposta imunológica por parte do hospedeiro. Há uma expansão de vários tipos de células, caracterizada sobretudo por linfócitos T CD4⁺, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (HOLZMULLER *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006). Se a resposta for do tipo Th1, citocinas como IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12 serão produzidas, promovendo ativação de macrófagos e, conseqüentemente, destruição dos parasitos. Por outro lado, se a resposta for do tipo Th2 serão produzidos IL-4 e IL-10. Estas citocinas provocarão uma baixa ativação macrofágica e, conseqüentemente, as formas clínicas aparecerão. A *Leishmania* é capaz de direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela persistência da infecção (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; REIS *et al.*, 2006).

Os estudos imunológicos na infecção por *L. (V.) braziliensis* estavam limitados aos estudos em humanos devido a falta de um modelo experimental para essa espécie. Em 2005, Moura *et al.* estabeleceram um modelo experimental para *L. (V.) braziliensis* utilizando camundongos BALB/c que apresentaram evolução clínica semelhante do homem. Entretanto, a dificuldade existente no estabelecimento desse modelo experimental ainda contribui para o surgimento de estudos com pacientes (CARVALHO *et al.*, 1995; CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1990; COUTINHO *et al.*, 1996; DA-CRUZ *et al.*, 2002; FARIA *et al.*, 2005; LEOPOLDO *et al.*, 2006; TELINO *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2001).

Apesar dos antimoniais serem as principais drogas contra a *Leishmania* ainda não se sabe corretamente o mecanismo de ação das mesmas (ARMIJOS *et al.*, 2004; YARDLEY *et al.*, 2006). E o mecanismo imune envolvido no processo de cura pode ser provavelmente diferente em cada tipo de tratamento. A quimioterapia associada a resistência a drogas e a toxicidade enfatizam a necessidade de uma

vacina eficaz contra a leishmaniose que promova uma correta resposta imune, como uma resposta Th1 (COLER; REED 2005). Para isso, estudos de novos antígenos potencialmente candidatos a vacinas e para testes de diagnósticos são necessários (COLER; REED, 2005; HABERER *et al.*, 1998).

Estudos anteriores, realizados por Brito *et al.* (2001), demonstraram que a fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis*, constituída por proteínas provenientes do citoplasma do parasito, promoveu resposta anticórpica em pacientes com LTA. Foi observado uma diminuição na reatividade anticórpica quando comparado soros de pacientes apresentando lesões ativas, antes e após tratamento específico. Resultado similar foi observado em indivíduos com cura espontânea, sugerindo que esses antígenos poderiam ser usados como marcadores de cura.

Visto que a imunidade mediada por células T desenvolve um papel fundamental na resposta do hospedeiro ao parasito *Leishmania* e que o papel de anticorpos específicos na resposta imune não está completamente esclarecido (TRUJILLO *et al.*, 1999), faz-se necessário caracterizar a resposta imune celular de PBMC ao estímulo com este antígeno antes e após o tratamento.

Além disso, a *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie responsável pela LTA no Brasil e tem a capacidade de causar desde a forma cutânea localizada até graves lesões mucocutâneas multilantes (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Embora estudos semelhantes tenham sido realizados por outros autores, foram avaliadas as respostas celulares a frações antigênicas totais de *L. (V.) braziliensis* (DA-CRUZ *et al.*, 2002; TELINO *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2001). Portanto, essa compreensão permitirá o estudo e a identificação de novas moléculas imunogênicas do parasito potencialmente candidatas a vacinas.

MATERIAIS E MÉTODOS

POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram selecionados quinze pacientes, de ambos os sexos, com idade superior a 12 anos, portadores de lesões ativas, diagnóstico confirmado e ausência de tratamento quimioterápico prévio. Todos os pacientes foram tratados com

Glucantime, apresentando cicatrização completa das lesões ao final da terapêutica. Após tratamento, os pacientes foram acompanhados por um período de 12 meses para confirmação de cura clínica e evitar o aparecimento de novas lesões e de recidivas. Todos os pacientes foram provenientes de áreas endêmicas de Pernambuco, onde *L. (V.) braziliensis* é a única espécie circulante. Os pacientes foram submetidos a coleta de sangue antes do tratamento quimioterápico e 12 meses após o término do tratamento. O grupo controle foi representado por 10 indivíduos saudáveis de área não endêmica, sem histórico da doença. Todos os participantes assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ.

ANTÍGENO

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), mantidas *in vitro*, foram expandidas em meio Schneider's contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 µg/ml) até atingir a fase exponencial. Em seguida, foram sedimentadas por centrifugação a 800 X g durante 15 minutos a 4°C e lavadas três vezes com salina tamponada (PBS - pH 7.2). Foram acrescentados inibidores de proteases (metil-fenil-fluoreto-PMSF, 0,1mM e ácido etilenodiaminotetra acético-EDTA, 2mM), pepstatina A 0,001M e, em seguida, ultrassonicadas. A suspensão parasitária foi centrifugada a 10000 X g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi removido e submetido a uma nova centrifugação a 100000 X g durante 1 hora, à mesma temperatura. A partir do sobrenadante resultante, fração antigênica solúvel, foi feita a determinação protéica.

OBTENÇÃO DE PBMC

Foram coletados 40 ml de sangue venoso periférico em tubo heparinizado e foi adicionado Ficoll-Hypaque. Após centrifugação a 400 X g durante 30 minutos a 20°C foi obtido um anel de PBMC. As células foram lavadas por centrifugação a 400 X g durante 30 minutos a 20°C em PBS. As PBMC foram contadas em câmara de Neubauer utilizando azul de Trypan, ajustando-se a concentração de interesse de acordo com cada ensaio realizado.

PROLIFERAÇÃO CELULAR

PBMC na quantidade de 2×10^5 /poço foram cultivadas em triplicata em placas de cultura plana de tecido de 96 poços em estufa a $37^\circ\text{C}/5\%$ de CO_2 durante cinco dias. As culturas foram estimuladas com $1,25\mu\text{g/ml}$ da fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis* e com o mitógeno concanavalina A (ConA- $2,5\mu\text{g/ml}$). Células apenas na presença de meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. Doze horas para o término do cultivo, foi adicionado $0,5\mu\text{Ci}$ de timidina tritiada ($[^3\text{H}]\text{TdR}$) (Amersham International, USA). Ao final desse período, o material foi coletado através do coletor automático de células e depositado em papel de fibra de vidro (Whatman AH). A radioatividade incorporada foi determinada através das radiações β emitidas expressas em contagem por minuto (CPM). Os resultados foram expressos pelo índice de estimulação (IE), como sendo a média aritmética da CPM das culturas estimuladas, dividida pela média aritmética da CPM das culturas não estimuladas, \pm desvio-padrão. O cut-off foi determinado pela média do grupo controle \pm dois desvios-padrões. Foram considerados valores representativos da proliferação positiva, índices de estimulação maior ou igual a 3.

AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DE CULTURA

Suspensões celulares (10^6 células/ml) em duplicata foram depositadas em placas de 24 poços. Os estímulos utilizados foram os mesmos dos ensaios de proliferação celular e as placas mantidas em estufa à $37^\circ\text{C}/5\%$ de CO_2 durante 48 horas. Após o tempo de incubação, as placas foram centrifugadas ($1800 \times g$ por 10 min, a TA) e os sobrenadantes de cultura coletados e estocados a -70°C .

A dosagem das citocinas IFN- γ e IL-10 nos sobrenadantes de cultura foi determinada através do ELISA de captura. Os anticorpos monoclonais utilizados foram do Kit OptEIA (BD Biosciences), sendo previamente titulados. Placas de ELISA (Nunc-96 poços) foram sensibilizadas com anticorpos anti-citocinas específicos (de acordo com o fabricante) e incubadas "overnight" a 4°C . Os padrões das citocinas foram diluídos a partir da concentração de 1000pg/ml em diluição

seriada com fator 2. Após lavagens, 50 µl da amostra e dos padrões foram adicionados em duplicata e a placa incubada por 2h a TA. Posteriormente, foram adicionados os anticorpos biotinizados específicos (de acordo com o fabricante) por 1h30min, a TA. Foi adicionado a solução reveladora contendo ABTS - 2,2-azino-de [sulfato(6)de 3-etil benzitiazolina]. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 1 M e a leitura realizada no espectrofotômetro (Bio-Rad 3550) a 415 nm. As concentrações das amostras foram calculadas na região linear da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/ml, utilizando o software Microplate Manager, versão 4.0 (Bio-Rad laboratories).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada empregando-se os testes não paramétricos. Para análise comparativa intra-grupos foi utilizado o teste dos postos sinalizados de Wilcoxon e para a análise entre grupos o teste U de Mann-Whitney. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Como controle positivo do teste, a ConA estimulou fortemente a linfoproliferação de PBMC no grupo controle e nos pacientes, antes e após tratamento, não sendo observada diferença significativa entre os grupos, mostrando que a resposta imune celular não foi suprimida (Figura 1).

Em relação ao estímulo com a fração antigênica solúvel, nenhum indivíduo do grupo controle apresentou resposta proliferativa. As culturas de PBMC dos pacientes antes e após tratamento proliferaram intensamente ao antígeno. Embora constatado pequeno aumento no IE após tratamento, não foi observado diferença significativa entre os pacientes ($p=0,944$). Comparando-se os IEs dos pacientes antes e após tratamento com o grupo controle, houve diferença significativa em relação aos níveis de proliferação ($p<0,001$) (Figura 2).

Assim como na proliferação, resultados similares foram encontrados entre os pacientes e o grupo controle após estímulo com ConA, não havendo diferença significativa na detecção de IFN- γ . Por outro lado, a produção de IL-10 foi

significativamente mais elevada nos pacientes comparado ao grupo controle. Entre os pacientes houve uma maior produção após tratamento, com diferença significativa.

Não foi detectada produção de IFN- γ nas culturas de PBMC do grupo controle sem estímulo. Embora pôde ser observada mínima produção de IFN- γ em PBMC de pacientes, antes e após tratamento, não foi evidenciada diferença significativa. Comparando o grupo controle com os pacientes, observa-se diferença significativa apenas com os pacientes antes do tratamento. Este resultado pode ser observada na Figura 5.

Em relação a produção das citocinas frente ao antígeno, os resultados demonstraram que os pacientes, antes e após tratamento, produziram uma maior quantidade de IFN- γ em relação ao grupo controle. A diferença significativa ficou evidenciada apenas entre os pacientes antes do tratamento comparado ao grupo controle. Diminuição desta citocina foi observada após o término do tratamento. Entretanto, não foi constatada diferença significativa (Figura 3).

Já os níveis de IL-10 foram mais elevados nos pacientes comparado ao grupo controle. Nos pacientes avaliados, embora a produção desta citocina tenha sido mais elevada após tratamento, não foi constatada diferença significativa ($p=0,307$). Diferença significativa foi encontrada comparando-se pacientes antes do tratamento com o grupo controle ($p=0,008$) (Figura 4).

DISCUSSÃO

As lesões cutâneas causadas pela *L. (V.) braziliensis* são normalmente susceptíveis ao tratamento com antimoniais e a cicatrização ocorre no final da terapia (COUTINHO *et al.*, 1996).

O “status” imunológico do hospedeiro infectado por *Leishmania* pode representar um papel importante no sucesso da quimioterapia, uma vez que infecções por este parasito estão associadas com uma imunossupressão do hospedeiro. Uma eficiente resposta imune mediada por células é necessária para a eficácia máxima do antimonial pentavalente e a relação entre a imunossupressão induzida pelo parasito e a quimioterapia efetiva é de grande importância (BERGER; FAIRLAMB, 1992).

A persistência de uma resposta imune celular específica a antígenos de *Leishmania*, após a cura clínica, poderá contribuir para a imunoproteção da doença. Um efeito benéfico indireto do tratamento com antimonial seria um aumento da resposta imune de células T após o tratamento (MENDONÇA *et al.*, 1986).

Estudos sobre a resposta imune celular na LTA também já foram desenvolvidos por alguns autores, utilizando-se antígenos totais de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Esses trabalhos mostraram uma tendência ao declínio da resposta linfoproliferativa após terapia, mesmo não se observando diferença significativa (COUTINHO *et al.*, 1996; 1998; DA-CRUZ *et al.*, 1994; TOLEDO *et al.* 2001).

Telino *et al.* (2005) demonstraram que o antígeno total de *L. (V.) braziliensis* apresentou uma proliferação significativamente mais elevada em relação ao antígeno total de *L. amazonensis*. Esse resultado pode ser explicado pelo fato dos pacientes estarem infectados por *L. (V.) braziliensis*.

Em relação aos antígenos de *L. amazonensis*, a resposta linfoproliferativa foi significativamente mais elevada com o antígeno total, comparado-se com a fração antigênica solúvel. Em contrapartida, não houve diferença na resposta com a fração insolúvel. A fração insolúvel apresentou uma antigenicidade mais elevada que a fração solúvel, sugerindo que as proteínas presentes nesta fração seriam mais antigênicas que o antígeno total. Contudo, pouco se sabe a respeito da antigenicidade entre as frações solúveis e insolúveis de promastigotas de *Leishmania* (TELINO *et al.*, 2005).

Em busca de alternativas para o tratamento, Toledo *et al.* (2001) demonstraram que pacientes tratados com imunoquimioterapia apresentaram uma resposta linfoproliferativa persistente durante o tratamento. Essa diferença na resposta é provavelmente relacionada com a presença *in vivo* do antígeno durante o tratamento.

Em relação aos pacientes tratados com Glucantime®, é esperado que *in vivo* a estimulação de células T diminua durante o progresso do tratamento para a cura. Isso ocorrerá desde que a redução na carga parasitária possa provavelmente causar a diminuição do número de células T responsivas. O mecanismo imune envolvido no processo de cura é, ao que tudo indica, diferente em cada tratamento (TOLEDO *et al.*, 2001).

Uma importante característica da infecção por *Leishmania* é a ocorrência de persistência parasitária, após cura clínica, com a finalidade de induzir uma resposta imune protetora pelas células T de memória e resistência a re-infecção (SCOTT, 2005).

O evento crucial para indução da resposta imune curativa contra a *Leishmania* é a eficiente ativação de células capazes de produzir citocinas protetoras. A análise na produção das citocinas IFN- γ e IL-10 identificou diferença significativa ao comparar o grupo de pacientes em relação ao controle. Após tratamento quimioterápico, embora sem diferença estatística, a dosagem dos sobrenadantes dos pacientes revelou diminuição nos níveis de IFN- γ e aumento de IL-10.

A existência de mecanismos de imunorregulação, necessários para promover uma resposta Th1 efetiva na LTA, pode explicar nossos resultados. Essa resposta é importante para manter a integridade tecidual do hospedeiro contra uma subsequente resposta inflamatória. Recentes estudos demonstraram que a resposta Th1, formada após infecção por *L. (V.) braziliensis*, é acompanhada pela resposta de células T produtoras de IL-10 (ANTONELLI *et al.*, 2004).

Citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12 podem ser tóxicas quando produzidas em quantidades elevadas e a IL-10 bloqueia a ativação de células Th1. Conseqüentemente, previne a superprodução dessas citocinas, evitando dano tecidual (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998).

Pompeu *et al.* (2001) identificaram que a produção de IFN- γ é proporcional a produção de TNF- α e IL-10. Usualmente, IL-10 exibe propriedades para desativar macrófagos em humanos. Altos níveis de IL-10 podem representar um contrabalanço necessário para uma resposta exacerbada, limitando o dano tecidual.

Em nosso estudo, a produção de IL-10 aumentada após o tratamento pode também ser explicada pela ação das células T regulatórias que utilizam essa citocina para limitar a ação do sistema imune, favorecendo a persistência do parasito após cura clínica (BELKAID *et al.*, 2002).

Apesar da importância da resposta Th1 na cura da infecção, vale ressaltar que as mesmas citocinas envolvidas no controle da infecção podem estar relacionada com a patogênese da doença. É necessário a existência de um

contrabalanço com as células produtoras de citocinas do tipo Th2, ou seja, uma dicotomia Th1 x Th2 (REIS *et al.*, 2006).

Portanto, considerando que a persistência parasitária, após cura clínica, é uma importante característica na infecção por *Leishmania* e pode induzir uma resposta imunológica protetora e resistente a re-infecção, pode-se concluir que há resposta proliferativa específica de PBMC de pacientes com LTA antes e após tratamento quimioterápico frente a fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis*.

Além disso, a produção de IFN- γ e IL-10, antes e após tratamento quimioterápico, indica que os pacientes produziram uma resposta celular específica, sugerindo que mecanismos de regulação imunológica com a participação de células T de memória e células T regulatórias, além da dicotomia Th1 x Th2 estão presentes na evolução clínica desses indivíduos.

FIGURAS

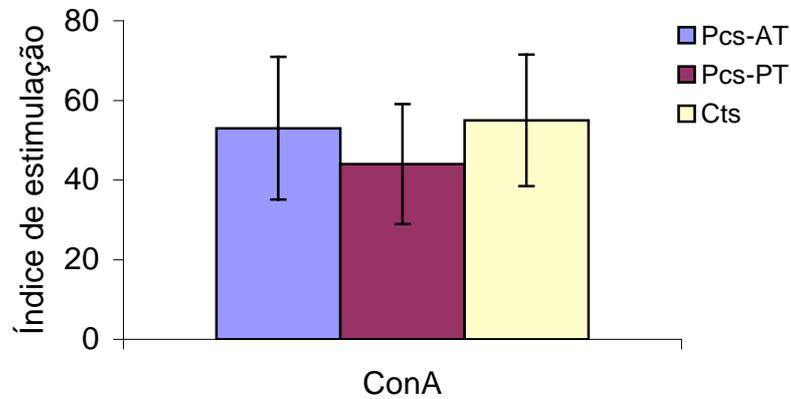


Figura 1: Gráfico comparativo da resposta linfoproliferativa de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT) e após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle (Cts) estimulado com ConA (2,5 µg/ml). A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE. As barras verticais representam o erro padrão.

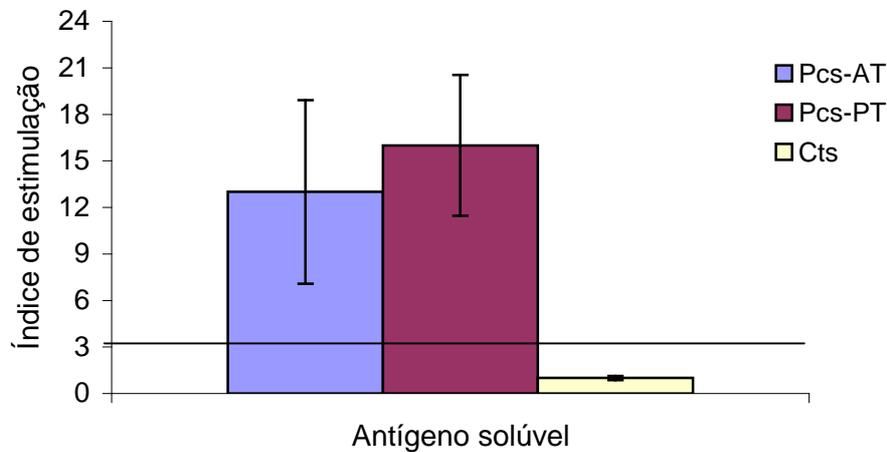


Figura 2: Gráfico comparativo da resposta linfoproliferativa de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT) e após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle (Cts) ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (1,25 µg/ml). A resposta linfoproliferativa foi expressa pelo IE. As barras verticais representam o erro padrão e a linha horizontal representa o *cut off*.

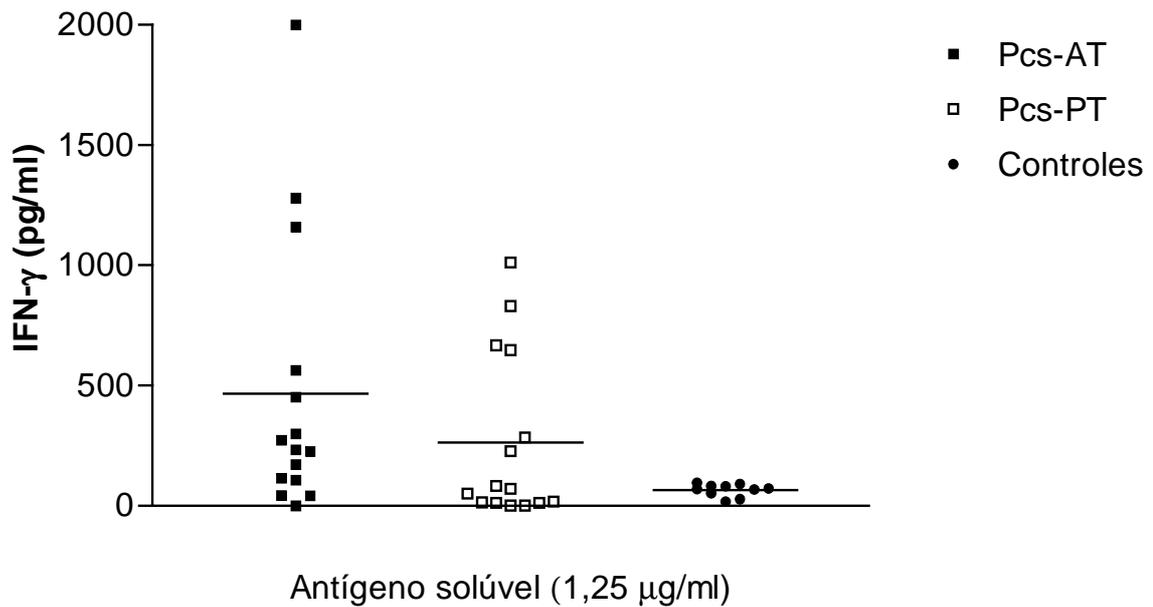


Figura 3: Gráfico da quantificação da produção de IFN- γ (pg/ml) em sobrenadante de cultura de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT), após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle na presença de 1,25 μ g/ml do antígeno solúvel de *L (V.) braziliensis*. As barras horizontais representam a média dos grupos

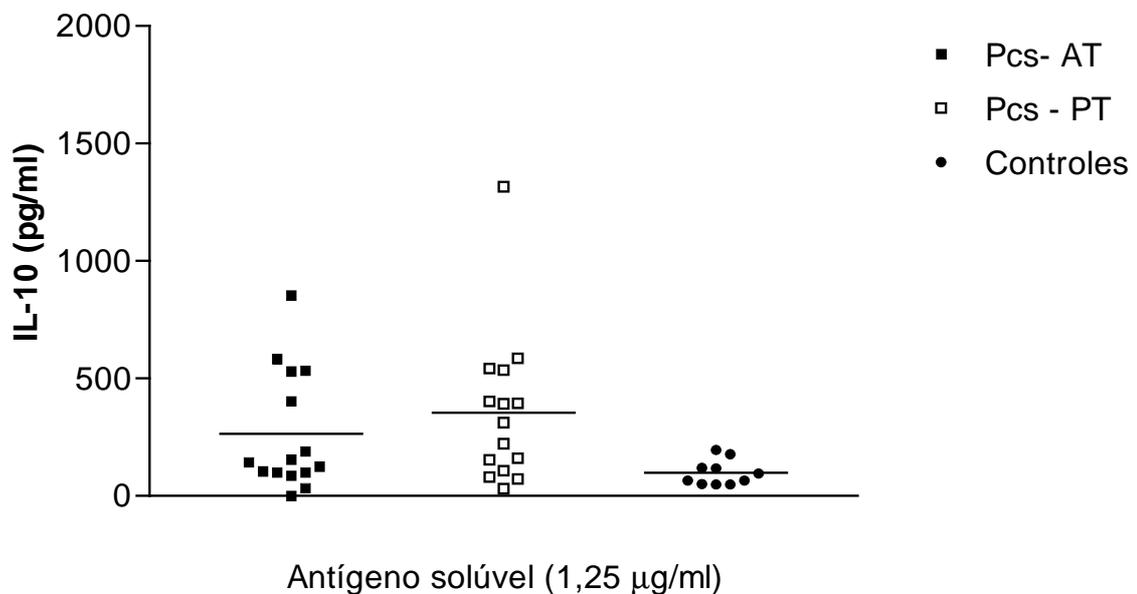


Figura 4: Gráfico da quantificação da produção de IL-10 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de PBMC dos pacientes de LTA antes (Pcs-AT), após tratamento quimioterápico (Pcs-PT) e do grupo controle na presença de 1,25 μ g/ml do antígeno solúvel de *L (V.) braziliensis*. As barras horizontais representam a média dos grupos.

Referências

1. ANTONELLI, L. R., *et al.* Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical Experimental Immunology**, Oxford, v. 136, p. 341-348, May., 2004.
2. ARMIJOS, R. X., *et al.* Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 91, p. 153-160, Jul., 2004
3. BELKAID, Y., *et al.* CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, London, v. 420, p. 502-507, Dec., 2002.
4. BERGER, B. J., FAIRLAMB, A. H. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. **Parasitology**, London, v. 105, p. S71-S78, 1992.
5. BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.28, n.1, p.121-134, Jan., 1998.
6. BRITO, M. E. F., *et al.* Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, p. 203-206, Mar-Apr., 2001.
7. CARVALHO, E. M., *et al.* Characterization of the immune response in subjects with self healing cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 53, n. 3, p. 273-277, Sep., 1995.
8. COLER, R. N., REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **TRENDS in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 244-249, May., 2005.
9. CONCEIÇÃO-SILVA, F., *et al.* Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 79, p. 221-226, Feb., 1990.
10. COUTINHO, S. G., *et al.* Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Sao Paulo, v. 31, p. 139-142, Jan., 1998.
11. COUTINHO, S. G., *et al.* T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 84, p.144-155, Nov., 1996.
12. DA-CRUZ, A. M., *et al.* Leishmania-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 6, p. 2614-2618, Jun., 1994.
13. DA-CRUZ, A. M., *et al.* T-cell mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, n. 2, p. 251-256, Apr., 2002.
14. FARIA, D. R., *et al.* Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses

- observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington v. 73, n.12, p. 7853-7859, Dec., 2005.
15. GONTIJO, B., CARVALHO, M. L. R. Leishmanose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p.71-80, Jan-Feb., 2003.
 16. HABERER, J. E., *et al.* *Leishmania pifanoi* amastigote antigen p-4: epitopes involved in t-cell responsiveness in human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3100-3105, Jul., 1998.
 17. HOLZMULLER, P., BRAS-GONÇALVES, R., LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, London, v. 132, p. S19-S32, 2006.
 18. LEOPOLDO, P. T. G., *et al.* Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on *in vitro* cytokine production. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 6, n. 75, p. 1-6, Apr., 2006.
 19. MENDONÇA, S. C., *et al.* Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 64, n. 2, p.269-276, May., 1986.
 20. POMPEU, M. M., *et al.* Differences in gamma interferon production *in vitro* predict the pace of the *in vivo* response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. **Infectious and Immunity**, Washington, v. 69, n. 12, p.7453-7460, Dec., 2001.
 21. REIS, L. C., *et al.* Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, maio-ago., 2006.
 22. RIBEIRO-DE-JESUS, A., *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 143-148, Jan., 1998.
 23. ROGERS, K. A., *et al.* Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 209, n. 1, p. 1-7, Mar., 2002.
 24. SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 12, p. 1707-1713, Dec., 2005.
 25. TELINO, E., *et al.* *In vitro* responses of human peripheral blood mononuclear cells to WORLD HEALTH ORGANIZATION le-cell, particulate and soluble extracts of *Leishmania* promastigotes. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 143, n. 2, p. 338-344, Feb., 2005.
 26. TOLEDO, V. P. C. P. Immunochemotherapy in American Cutaneous Leishmaniasis: Immunological Aspects before and after Treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 1, p. 89-98, Jan., 2001.
 27. TRUJILLO, C., *et al.* The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 203-209, Dec., 1999.
 28. YARDLEY, V., *et al.* American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 194, n. 8, p. 1168-1175, Oct., 2006.

ANEXO A – Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ

Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CPqAM/FIOCRUZ

Título do Projeto: "Caracterização da resposta imune celular em portadores de Leishmaniose Americana antes e após tratamento quimioterápico, utilizando-se a fração solúvel de Leishmaniose braziliensis."

Pesquisador responsável: Valéria Rego Alves Pereira

Instituição onde se realizará o projeto: CPqAM- FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 02.09.2004

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 27/04

PARECER

A Comissão avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/96, e complementares.

Recife, 01 de dezembro de 2004

Ana Maria Aguiar dos Santos

Dr^a Ana Maria Aguiar dos Santos
Médica
Coordenação
CEP/CPqAM/FIOCRUZ