

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AMANDA BEATRIZ RODRIGUES BARRETO DE MACEDO

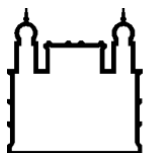
**ESTUDO DA QUALIDADE DA RESPOSTA TH1
INDUZIDA POR ANTÍGENOS DE PROMASTIGOTAS
DE *L. (V.) braziliensis* E *L. (L.) amazonensis*
EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES
COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

ORIENTADORA: Dr^a Paula Mello De Luca

RIO DE JANEIRO

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: Amanda Beatriz Rodrigues Barreto de Macedo

**ESTUDO DA QUALIDADE DA RESPOSTA TH1
INDUZIDA POR ANTÍGENOS DE PROMASTIGOTAS
DE *L. (V.) braziliensis* E *L. (L.) amazonensis*
EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES
COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

ORIENTADORA: Dr^a Paula Mello De Luca

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Renato Porrozi de Almeida (IOC/FIOCRUZ)-Presidente

Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas (IOC/FIOCRUZ)

Prof^a. Dra. Andrea Alice Silva (Depto Patologia/Universidade Federal Fluminense)

Data: 12/04/2011

RIO DE JANEIRO

2011

Aos meus pais, Beatriz e José. Com amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter colocado pessoas e oportunidades maravilhosas no meu caminho e por me fazer aprender a cada dia.

À equipe do Centro de Referência de Leishmaniose e do Ambulatório do IPEC: Dr. Armando Schubach, Dra Mariza Salgueiro, Dra Erica, Dra Maria Inês Pimentel, Dr. João Moreira, Dra Claudia Valete, Dra. Maria de Fatima Madeira, Dra Eliane M. Comfort.

Ao curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular e sua equipe, pelo apoio e prestatividade com que contribuíram para a minha formação nesses dois anos.

Ao Alessandro Marins, pela aquisição de cada uma das várias amostras de cada paciente no citômetro e pela paciência em fazer de tudo para ajudar, incluindo as idas inesperadas para UFF. OBRIGADAAA!

À plataforma de citometria de fluxo coordenada pela Dr Andrea Henriques Pons.

Ao Departamento de Patologia da UFF por permitir a aquisição enquanto o citômetro da Fiocruz apresentava problemas.

À Cynthia Cascabulho pela amizade e ajuda com o CBA na reta final dos experimentos.

A Dr Lea Cysne pela ajuda e carinho que sempre me ofertou.

Aos pacientes que aceitaram entrar para o estudo, cada tubo de amostra que concederam doar.

À Kátia por deixar o escritório e o laboratório sempre bem limpinhos.

Aos amigos Elisangela, Raquel, Daniel e Juan pelo apoio e momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

A Dr Laila Nahun, que durante e após sua passagem pelo laboratório, mostrou o que é se dedicar e lutar pelas escolhas que fazemos.

Ao revisor Dr Paulo Renato Zuquim pela revisão criteriosa da dissertação

A todos do Laboratório de Imunoparasitologia, pesquisadores, técnicos e alunos, pela convivência cordial e cooperação durante todos esses anos.

Ao Dr Sérgio Mendonça por me acolher e incentivar desde a minha chegada ao laboratório, em 2006.

À minha orientadora Paula De Luca, por ser ao mesmo tempo mestre, mãe e amiga durante esses 5 anos. Pelo exemplo de profissional e pessoa que é.

A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem
Guimarães Rosa

"...aprender não é um ato findo.
Aprender é um exercício constante de renovação..."
Paulo Freire

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
SUMÁRIO.....	vi
SUMÁRIO DE TABELAS.....	vii
SUMÁRIO DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. Introdução.....	1
1.1. Epidemiologia e aspectos históricos da doença.....	1
1.2. Agente etiológico.....	3
1.3. Ciclo Biológico.....	4
1.4. Leishmaniose tegumentar americana.....	5
1.5. Tratamento e profilaxia.....	8
1.6. Resposta imune na leishmaniose.....	9
1.7. Os perfis Th1/Th2 na leishmaniose tegumentar americana.....	17
1.8. Vacinas na Leishmaniose.....	20
1.9. A importância de adjuvantes em vacinas.....	23
1.10. Células CD4 ⁺ Th1 Multifuncionais.....	24
2. Objetivos.....	27
3. Material e Métodos.....	28
3.1 Casuística.....	28
3.2 Preparações dos extratos totais e das frações antigênicas.....	29
3.3 Processamento das amostras para microscopia eletrônica de transmissão.....	30
3.4. Coleta de material biológico.....	31
3.5. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico.....	31
3.6. Marcação de citocinas para citometria de fluxo multiparamétrica.....	31
3.7 Análises dos fenótipos de linfócitos e da produção de citocinas.....	32

3.8 ELISA de IFN- γ	34
3.9 Análises estatísticas.....	34
4. Resultados.....	35
4.1 Análise ultraestrutural das frações enriquecidas de membrana, organela, e de componentes particulados de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	35
4.2 Percentuais de células CD4 ⁺ e CD8.....	35
4.3 Frequência de células CD4 ⁺ CD25.....	35
4.4 iMFI de células CD4 ⁺ produtoras de citocinas.....	39
4.5 iMFI de células CD8 ⁺ produtoras de citocinas.....	43
4.6 Avaliação de fenótipo de células multifuncionais e células produtoras de uma ou duas citocinas.....	44
4.7 Avaliação da produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 pelos fenótipos de células CD4 ⁺ Th1 através da intensidade média de fluorescência (MFI).....	57
4.8 Análise quantitativa da produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas estimuladas com os antígenos totais LbT e PH8T, e com as frações antigênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	60
5. Discussão.....	62
6. Conclusões.....	73
7. Referências bibliográficas.....	74
8. Anexos.....	94
8.1 Anexo I- Termo de consentimento Livre e Esclarecido.....	94
8.1 Anexo II- Resultados preliminares.....	97

Sumário de Tabelas

Tabela 1.1 Células do sistema imune inato e seus papéis na Leishmaniose murina (Adaptada de Nylém & Gautam, 2010).....	11
Tabela 3.1 Grupos dos participantes do estudo, composto por pacientes com leishmaniose antes, após o tratamento, e indivíduos saudáveis	28
Tabela 4.1 Intensidade Média de Fluorescência de IFN- γ , TNF α e IL-2 das células produtoras de uma, duas ou três citocinas dos pacientes do grupo pós-tratamento.....	59

Sumário de Figuras

Figura 1.1 Modelo murino do desenvolvimento das respostas imunes dos tipos Th1 e Th2 por <i>Leishmania (L.) major</i> . Sacks & Noben-Trauth, 2002.....	14
Figura 1.2 Desenvolvimento linear de células Th1 CD4+ baseada na produção de citocinas (Adaptada de Seder et al., 2008).....	26
Figura 3.1 Esquema do protocolo para obtenção das preparações enriquecidas de frações subcelulares.....	30
Figura 4.1 Análise ultraestrutural das preparações antigênicas de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> por microscopia eletrônica de transmissão: (A) Fração enriquecida de membranas; (B) Fração particulada; (C) Fração rica em organelas.....	36
Figura 4.2 Percentuais de linfócitos T CD4+ (azul) e CD8+(vermelho) induzidos pelos antígenos totais LbT e PH8T, e pelas diferentes frações de <i>L. (L.) amazonensis</i> (PH8S, PH8M, PH8O, PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT), e no grupo controle (Ctrl).....	37
Figura 4.3 Percentuais de linfócitos T CD4+CD25+ induzidos pelos antígenos totais LbT e PH8T, e pelas diferentes frações de <i>L. (L.) amazonensis</i> (PH8S, PH8M, PH8O, PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento, e no grupo controle.....	38
Figura 4.4 iMFI das células T CD4+ produtoras de IFN γ , induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T, e pelas diferentes frações de <i>L. (L.) amazonensis</i> (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes e após o tratamento, e no grupo controle	40
Figura 4.5 iMFI das células T CD4+ produtoras de TNF α , induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T, e pelas diferentes frações de <i>L. (L.) amazonensis</i> (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes e após o tratamento (e no grupo	

controle	41
Figura 4.6 iMFI das células T CD4+ produtoras de IL-2, induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T, e pelas diferentes frações de <i>L. (L.) amazonensis</i> (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes e após o tratamento, e no grupo controle	42
Figura 4.7 iMFI das células T CD8+ produtoras de IFN γ , induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T, e pelas diferentes frações de <i>L. (L.) amazonensis</i> (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes e após o tratamento e no grupo controle.....	44
Figura 4.8 iMFI das células T CD8+ produtoras de TNF α , induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T, e pelas diferentes frações de <i>L. (L.) amazonensis</i> (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes e após o tratamento e no grupo controle	45
Figura 4.9 iMFI das células T CD8+ produtoras de IL-2, induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T, e pelas diferentes frações de <i>L. (L.) amazonensis</i> (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes e após o tratamento e no grupo controle.....	46
Figura 4.10 Percentuais de células T CD4+ produtoras de três, duas ou uma única citocina, após estimulação com os extratos totais LbT e PH8T.....	50
Figura 4.11 Percentuais de células TCD4+ produtoras de três, duas ou uma única citocina, após estimulação com extrato total (PH8T) e frações antigênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i> (PH8S, PH8M, PH8O, PH8P).....	51
Figura 4.12 Contribuição (proporções) de cada fenótipo de células produtoras de citocinas para a resposta imune do tipo Th1, avaliada após estimulação de células mononucleares de sangue periférico com os extratos totais LbT e PH8T, e frações antigênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	52
Figura 4.13 Percentuais de células T CD8+ produtoras de três, duas ou uma única citocina, após estimulação com os extratos totais LbT e PH8T As barras mostram as medianas e os pontos os valores individuais dos grupos de pacientes antes (verde) e pós-tratamento (vermelho) e do grupo controle (azul).....	54
Figura 4.14 Percentuais de células T CD8+ produtoras de três, duas ou uma única citocina, após estimulação com o extrato total (PH8T) e as frações antigênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	

(PH8S, PH8M, PH8O, PH8P).As barras mostram as medianas e os pontos os valores individuais dos grupos de pacientes antes (verde) e pós-tratamento (vermelho) e do grupo controle55

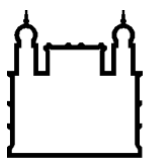
Figura 4.15 Contribuição (proporções) de fenótipo de células produtoras de citocinas na resposta imune de linfócitos avaliada após estimulação de células mononucleares de sangue periférico com os extratos totais LbT e PH8, e frações antigênicas de *L.(L.)amazonensis*, no grupo AT;no grupo de pacientes PT e indivíduos controle (Ctrl).....56

Figura 4.16 Níveis de IFN- γ (pg/ml) detectados nas culturas de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com os antígenos totais LbT e PH8T e as diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S,PH8M,PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e pós o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl), pela técnica de ELISA. As linhas horizontais indicam os valores da mediana de cada grupo.....61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC: Célula apresentadora de antígeno
BHI: Infusão de agar cérebro e coração
BSA: Albumina sérica bovina
CBA: *Cytometric Bead Array*
CD: *Cluster of Differentiation*
ConA: Concanavalina A
CR: Receptor de complemento
CMSP: Células mononucleares do sangue periférico.
DNA: ácido desoxirribonucleico
ELISA: Ensaio imunoenzimático
gp63: glicoproteína 63 (leishmanolisina)
HLA: Antígeno leucocitário humano
IDRM: Intradermorreação de Montenegro
IFN- γ : Interferon- γ
IgG: Imunoglobulina G
IL: Interleucina
IL-10R: Receptor de Interleucina-10
KO: *Knock out*
La: *Leishmania (L.) amazonensis*
Lb: *Leishmania (V). braziliensis*
LbT: extrato total de *Leishmania (V). braziliensis*
LC: Leishmaniose Cutânea
LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa
LM: Leishmaniose Mucosa
LPG: Lipofosfoglicano
LPS: Lipopolissacarídeo (endotoxina)
LV: Leishmaniose Visceral
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
MPL-SE: *monophosphoryl lipid A in stable emulsion*
mRNA: RNA mensageiro
MIP: *Macrophage inflammatory protein*
NK: Célula *Natural-Killer*

NNN: Meio de cultura McNeal, Novy & Nicolle
NOD- *Nucleotide-binding oligomerization domain*.
OMS: Organização Mundial da Saúde
PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*
PH8T: Extrato total de *Leishmania (L.) amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH8)
PH8S: Fração solúvel *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8)
PH8M: Fração enriquecida de membrana de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8)
PH8O: Fração enriquecida de organelas de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8)
PH8P: Fração particulada de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8)
PIB: Produto interno bruto
PKC: Proteína Kinase C
STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*
TCR: Receptor de célula T
TGB- β : *Transforming growth factor- β*
Th: Células T *helper*
TLR- Receptor do tipo *Toll*
TNF- α : Fator de necrose tumoral- α
Treg: Células T reguladoras
VP: Vacúolo Parasitóforo



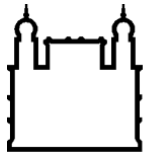
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

As Leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que afetam indivíduos em aproximadamente 88 países. Atualmente, a medida de controle da doença mais aceita é o desenvolvimento de uma vacina profilática; porém, para que uma vacina efetiva seja alcançada, torna-se necessário a compreensão dos fatores que regulam e participam na proteção durante e após a infecção natural. São comuns trabalhos em que a resposta imune do tipo Th1 é medida exclusivamente pela produção *in vitro* de IFN- γ , porém a avaliação de um só parâmetro nem sempre é suficiente para predizer proteção. O presente trabalho visou estudar a qualidade de resposta Th1 induzida por diferentes antígenos de *Leishmania* em pacientes com a forma cutânea de leishmaniose tegumentar americana (LTA) provenientes do RJ. Utilizando-se ensaios de citometria de fluxo multiparamétrica para marcadores de superfície, e para as citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ , bem como ELISA para IFN- γ , foram feitas comparações da resposta induzida pelos extratos totais de promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* (LbT) e *L. (L.) amazonensis* (PH8T), assim como frações enriquecidas em componentes subcelulares de *L. (L.) amazonensis*, em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LTA, antes e 140 dias após o tratamento, e indivíduos controles sadios. A análise das subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo não identificou alterações significativas nos percentuais de células CD8⁺, CD4⁺ e CD25⁺ induzidas pelos diferentes estímulos, dentro de um mesmo grupo, nem entre os grupos de pacientes e controles. A avaliação individual da MFI integrada (frequência de células produtoras de uma citocina multiplicada pela intensidade média de fluorescência) para cada citocina estudada, não evidenciou nenhuma diferença marcante na resposta imune do tipo Th1 induzida pelos diferentes estímulos; porém, através da avaliação da contribuição dos fenótipos CD4⁺ produtores de 3, 2 ou 1 única citocina na resposta imune do tipo Th1 total, observamos diferenças qualitativas bem distintas entre as respostas obtidas antes e após o tratamento, e entre os antígenos estudados. Todos os estímulos apresentaram aumento da proporção de células multifuncionais nos pacientes PT, em relação aos AT. Após o tratamento, LbT foi o estímulo que induziu maior proporção de células multifuncionais (produtoras de IL-2, TNF- α e IFN- γ , simultaneamente; 28%), seguido da fração de membrana de *L. (L.) amazonensis* (PH8M; 23%), enquanto que, PH8T induziu a menor proporção de células multifuncionais (10%), e a maior proporção de células simples produtoras de IFN- γ (38%). Corroborando alguns outros relatos da literatura, observamos que as células multifuncionais são as que possuem a maior intensidade média de fluorescência para as 3 citocinas estudadas. A avaliação quantitativa da produção de IFN- γ por ELISA, demonstrou que LbT foi o estímulo que induziu significativamente a maior produção desta citocina, em comparação aos demais estímulos, tanto antes como após o tratamento. Este último resultado parece se correlacionar com os dados de citometria já mencionados, em que este mesmo estímulo foi capaz de induzir o maior percentual de células T multifuncionais, células essas com a capacidade de produzir uma quantidade maior de citocinas, do que os outros fenótipos estudados, como evidenciado nos resultados de MFI. Nossos resultados levam a discussão sobre a importância da avaliação da qualidade de uma resposta imune do tipo Th1 medida por mais de um parâmetro, a nível de uma única célula, e sugerem que a avaliação das células multifuncionais é importante para correlacionar com a cura da doença.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of disease caused by different species of protozoan parasites from the genus *Leishmania*, that affects 88 countries around the world. Currently, the most accepted approach to control the disease is a prophylactic vaccine. However, to develop such a vaccine, it becomes necessary to understand the factors that regulate and participate in the healing process as well as protection during and after natural infection. It is well established that Th1-immune response is important for the protection against intracellular parasites. Many studies evaluate this response only by the *in vitro* IFN- γ production, but the evaluation of this single parameter not always is sufficient to predict protection. The present work assessed the quality of the Th1-immune response induced by different *Leishmania* antigens in patients affected with the cutaneous form of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) from Rio de Janeiro, Brazil. Using multiparametric flow cytometry to access surface markers and cytokines, such as IL-2, TNF- α and IFN- γ , as well as ELISA to measure IFN- γ in culture supernatants, we evaluated the immune responses induced by total antigens of stationary phase promastigotes of *L. (V.) braziliensis* (LbT) and *L. (L.) amazonensis* (PH8T), as well as subcellular components, composed of enriched fractions of *L. (L.) amazonensis* promastigotes, in peripheral blood mononuclear cells of ATL patients, before and 140 days after antimonial therapy, and healthy controls. Analysis of the T lymphocytes subpopulations by flow cytometry did not show significant variations in the percentage of CD4⁺, CD8⁺ and CD25⁺ cells induced by all different stimuli within the same group, or among the three studied groups. The individual evaluation of integrated MFI (frequency x MFI) for each cytokine assessed did not show any marked difference in the Th1-immune response induced by the different stimuli; however, by assessing the contribution of the CD4⁺ phenotypes producing 3, 2, or a single cytokine in the total Th1-immune response, we were able to identify very interesting differences. In the group of patients analyzed after treatment, LbT induced the highest proportion of multifunctional CD4⁺ T cells (producing IL-2, TNF- α and IFN- γ , simultaneously; 28%), followed by the membrane fraction of *L. (L.) amazonensis* (PH8M; 23%), whereas PH8T induced the lowest proportion of multifunctional CD4⁺ T cells (10%) and the highest proportion of single positive-cells for IFN- γ (38%). Corroborating previously published data, our results also showed that multifunctional CD4⁺T cells are those with the highest mean fluorescence intensity for the three cytokines studied. The quantitative evaluation of IFN- γ by ELISA showed that LbT significantly induced the higher production of this cytokine, in comparison to the other stimuli, both before and after treatment. This last result appears to show a relationship with our flow cytometry data, in which the same antigen was able to induce the highest percentage of multifunctional T cells, coincidentally the cells that produced the larger amounts of cytokines, in comparison to the other CD4⁺ T cells phenotypes, as observed by the MFI values. Our results support the actual discussion about the importance of evaluating not only the quantity, but also the quality of a Th1-immune response by more than one parameter at a single-cell level, and indicate the importance of studying multifunctional CD4⁺ T cells in the cure of of ATL lesions.

1. INTRODUÇÃO

Esta dissertação visa como meta principal estudar a qualidade e magnitude da resposta imune do tipo 1 de pacientes com a forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana induzida *in vitro* por extratos totais de promastigotas de fase estacionária de *Leishmania* (V.) *braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* e de frações enriquecidas em componentes subcelulares de *L. (L.) amazonensis*. Este tipo de avaliação é importante para a seleção de imunógenos que possam compor uma vacina contra leishmaniose, já que a estratégia atualmente adotada para se desenvolver uma vacina efetiva contra as leishmanioses envolve a compreensão dos fatores que regulam e participam na proteção durante e após a infecção natural. Neste trabalho, aplicamos uma diferente abordagem, que vem sendo recentemente relatada na literatura, no estudo da resposta imune mediada por células em doenças infecciosas, e que envolve a avaliação de mais de um parâmetro imunológico a nível de uma única célula, por citometria de fluxo. A seguir, apresentamos uma revisão sobre aspectos gerais da doença relacionados com o parasita, formas clínicas e imunopatologia, assim como sobre a diferenciação linear de células CD4 Th1, baseada na produção de citocinas.

1.1 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS HISTÓRICOS DA DOENÇA.

As Leishmanioses são doenças antigas causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que afetam indivíduos em aproximadamente 88 países, localizados no sudeste da Europa, norte da África, Oriente Médio, subcontinente indiano, Américas Central e do Sul (Desjeux, 2001). São doenças com um amplo espectro clínico, que podem acometer a pele e/ou a mucosa (forma tegumentar) e órgãos internos como fígado e baço (forma visceral), dependendo da espécie envolvida e da resposta imune do hospedeiro infectado.

Há indícios de que a doença seja muito antiga, pois foram encontrados relatos de diferentes locais e cerâmicas pré-incas do Peru e Equador representando pacientes com lesões na pele e mucosas do primeiro século a.C. (WHO, 2002).. O desfiguramento do nariz e da boca causado pela forma mucocutânea da doença já foi chamado de “lepra branca”, pela semelhança com a lepra. Na Índia, a forma visceral era chamada de “kala-azar”, que quer dizer febre negra. Em 1908, Leishman reconhece a semelhança com a forma arredondada dos trypanossomas, e no mesmo ano, Donovan descreve o parasita no calazar. O termo *Leishmania* foi denominado por Ross, em 1903 (WHO, 2002).

No Brasil, desde 1829 existem referências com menções da doença na Amazônia. Em 1895, Moreira identifica pela primeira vez o botão endêmico dos países quentes, sendo chamado de botão da Bahia. Na região de Bauru (SP), aumentou-se o interesse pelo estudo da

doença com a epidemia que acometeu a população e os operários envolvidos na construção da Estrada de Ferro Noroeste. Na época, Lindenberg encontrou os parasitos nos indivíduos acometidos pela forma cutânea e Splendore os encontrou nas lesões mucosas. Gaspar Vianna finalmente nomeou esses parasitos de *Leishmania braziliensis* (Medeiros, 1999).

Estudos mais atuais têm demonstrado que a doença aumentou a nível mundial nas últimas décadas, devido a fatores como urbanização, devastação de florestas, resistência do parasito às drogas atualmente utilizadas, falta de controle de reservatórios e dos vetores, infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos, turismo, fatores econômicos e conflitos políticos. A guerra do Iraque fez com que mais de 600 soldados americanos contraíssem a doença (Gontijo & Carvalho, 2003). Outros fatores, como a melhora no diagnóstico e notificação dos casos podem ter contribuído para o aumento dos casos da doença.

A incidência anual é estimada em 1-1,5 milhões de casos da forma cutânea e 500.000 casos da forma visceral (Desjeux, 2001; Gontijo & Carvalho, 2003). Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam sob risco de contrair a doença (Desjeux, 2004). Alguns fatores, como desnutrição e infecções respiratórias e intestinais, tornam as populações mais suscetíveis à infecção. A forma visceral tem emergido como uma infecção oportunista entre pacientes infectados pelo vírus HIV em locais de endemicidade conhecida (Ebrahin, 2000).

Para efeitos didáticos, as leishmanioses são classificadas dependendo das regiões geográficas onde se apresentam: leishmanioses do Novo Mundo e do Velho Mundo. As classificadas como do Velho Mundo são causadas por espécies de *Leishmania* encontradas na bacia mediterrânea, Oriente Médio, África e Ásia. As leishmanioses do Novo Mundo (visceral e tegumentar americana) são causadas por espécies encontradas nas Américas Central e do Sul.

Essas doenças possuem duas principais situações ou entidades epidemiológicas: a zoonótica e a antroponótica. No ciclo de transmissão zoonótico, animais domésticos e silvestres são considerados reservatórios e possuem o papel de manter e disseminar os parasitas. Esse padrão está presente tanto na América Latina quanto nos países do Velho Mundo e os fatores de risco para a doença são a urbanização, a devastação de florestas e as migrações de áreas rurais para urbanas. No ciclo de transmissão antroponótico, os humanos são considerados a única fonte de infecção para o vetor flebotomíneo. Esse ciclo abrange as duas formas principais da doença e está restrito ao Velho Mundo, onde a migração de áreas rurais para urbanas e entre países fronteiriços representa o principal fator de risco para transmissão da leishmaniose (Desjeux, 2001).

Alterações no ambiente modificaram a ecologia de algumas espécies, dos seus vetores e, conseqüentemente, da epidemiologia das leishmanioses. Observa-se uma tolerância e adaptação do vetor flebotomíneo às drásticas mudanças ecológicas. Algumas espécies sofreram completamente ou parcialmente o processo de domiciliação (da Costa et al., 2007). Teodoro e colaboradores (1999) relataram que, apesar das derrubadas de árvores e do uso de inseticidas nos arredores de florestas, houve um aumento na população de *Lutzomyia whitmani* s.l., uma das espécies envolvidas na transmissão de *L. braziliensis*.

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico das leishmanioses é um parasita pertencente taxonomicamente ao Reino Protista, Filo Sarcomastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania*. Existem dois subgêneros com padrões de desenvolvimento diferentes no intestino do hospedeiro invertebrado: o grupo que foi enquadrado no subgênero *Viannia*, que se desenvolve no intestino posterior ou “peripilaria”, e o subgênero *Leishmania*, que cresce no intestino anterior e médio, ou seção “suprapilaria” (Killick-Kendrick et al., 1979; Lainson & Shaw, 1987; Sacks & Kamhawi, 2001).

O ciclo de vida é heteroxeno e existem duas formas evolutivas do parasita: a promastigota e a amastigota. A forma promastigota é alongada, mede de 8 a 15 µm, possui um flagelo que emerge do corpo celular permitindo a sua motilidade, vive extracelularmente na luz do trato digestivo do hospedeiro invertebrado (dípteros fêmeas da sub-família Phlebotominae e dos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo, e *Phlebotomus* no Velho Mundo). A forma amastigota é ovóide e mede de 3-5µm, o flagelo não é exposto, permanecendo interiorizado num compartimento chamado bolsa flagelar que, além de compartimentalizar o flagelo, realiza a endocitose e exocitose em ambas as formas evolutivas. Por microscopia óptica, pode-se identificar o núcleo oval ou redondo e também o cinetoplasto, que é a mitocôndria. A forma amastigota é obrigatoriamente intracelular, hospedando-se principalmente nos macrófagos dos hospedeiros mamíferos de várias espécies (Gontijo & Carvalho, 2003; Singh, 2006).

A principal forma de infecção é pela picada do flebótomo infectado, que durante o repasto sanguíneo “regurgita” as formas promastigotas na pele do vertebrado. Outra forma de transmissão é a parenteral, através de acidentes de laboratório e, no caso da forma visceral da doença, por transfusão de sangue e compartilhamento de seringas (Herwaldt, 1999). Existem também relatos de caso sobre a transmissão sexual e da possibilidade de transmissão através de fluidos contaminados de pacientes com leishmaniose visceral (Singh, 2006).

Como referido anteriormente, a doença possui diferentes formas clínicas, dependendo da espécie da *Leishmania* e do status imunológico do hospedeiro vertebrado, podendo ocorrer a forma cutânea, mucocutânea, difusa e visceral. Clinicamente, divide-se a doença em dois grandes grupos: visceral e tegumentar. A forma visceral é a mais grave e pode ser letal se não tratada. É causada por espécies viscerotrópicas como *L. (L.) chagasi* que parasitam órgãos internos, principalmente aqueles ricos em fagócitos mononucleares, como fígado, baço, medula óssea e linfonodos. A forma cutânea afeta a pele e/ou mucosas e, dependendo da espécie e da resposta imune do indivíduo infectado, tem auto-resolução, porém pode trazer problemas sociais aos pacientes dependendo da localização das lesões. No Afeganistão, onde as lesões ocorrem comumente no rosto, as mulheres afetadas pela doença são julgadas inapropriadas para o casamento e de terem filhos (Reithiger, 2003).

1.3. CICLO BIOLÓGICO

Após a cópula, o díptero flebotomíneo do sexo feminino não infectado que se alimentava de seiva de plantas, passa a ter a necessidade de se alimentar de sangue para maturar os seus ovos (www.fiocruz.br). Então, realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero, com ajuda de substâncias secretadas junto à saliva, que possuem efeito anticoagulante, vasodilatador e antiplaquetário (Lerner et al., 1991). Se o hospedeiro estiver infectado, ocorre a aspiração dos macrófagos parasitados, contendo as formas amastigotas, junto ao sangue. As amastigotas chegarão ao intestino médio ou posterior. Após aproximadamente 18h, ocorrerá a transformação para a forma promastigota, a qual irá sofrer multiplicações e diferenciações até chegar na forma evolutiva chamada promastigota metacíclica, que não se divide mais e migra para as regiões da faringe, esôfago e probóscide do inseto. No momento da picada e aspiração do sangue, as formas metacíclicas são regurgitadas na derme do hospedeiro mamífero (Sacks et al., 2001).

As formas promastigotas infectam preferencialmente células fagocíticas, principalmente macrófagos e células dendríticas, e podem infectar também outras células, como neutrófilos e fibroblastos (Kima, 2007). Elas expressam lipofosfoliglicano (LPG) e a metaloprotease gp63 em sua superfície, que são fatores de virulência importantes e estão envolvidas na adesão ao macrófago. A entrada na célula é feita através de dois tipos de fagocitose: o mecanismo *zipper* e a captura por pseudópodes em espiral. O primeiro mecanismo provoca a iniciação de um recrutamento de actina e outros componentes do citoesqueleto para a região de ligação do parasita, ocorrendo à formação de um pseudópode que engolfa o parasita em um fagossoma. Já no segundo mecanismo, ocorre a formação de pseudópodes em espiral ao redor do parasita, que realizam a captura deste para o meio

intracelular (Ritting & Bogdan, 2000; Handman et al., 2002). A interação do parasito com receptores do complemento pode ocorrer por ativação de C3 e ligação do fragmento C3bi (C3b inativado) ao receptor de complemento (CR) ou ocorre ligação direta, independente do soro, da gp63 e lipofosfoglicano aos receptores de complemento. A participação dos receptores de complemento não desencadeia o *burst* respiratório, facilitando a sobrevivência dos parasitos (Russel & Wright, 1988).

A *Leishmania* é interiorizada no fagossoma que é contínuo com a membrana externa. O fagossoma sofre uma modificação através da fusão com lisossomas secundários, resultando numa estrutura chamada fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo (VP). O VP é um compartimento ácido e apresenta mecanismos enzimáticos com capacidade microbicida. A infecção inibe a produção de superóxidos e peróxido de hidrogênio, mas o pH e o transporte vesicular não são alterados (Antoine et al., 1990). Dependendo da espécie, pode-se encontrar um amastigota individualmente em um VP que se divide e secreta novos vacúolos com um único parasita em cada um, como no caso das espécies *L.(L.) donovani*, *L (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* (causadoras da forma visceral), ou vários amastigotas convivem em um só vacúolo que vai se expandindo continuamente até o vacúolo arrebentar e liberar os parasitos, como no caso de *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) piffanoi*. As repetidas divisões binárias levam a lise das células e a liberação das novas formas amastigotas, que vão invadir outras células, perpetuando o ciclo vital (McMahon-Pratt & Alexander, 2004; Kima, 2007). A doença, uma vez instalada, pode evoluir para a cura, para a cronicidade ou até mesmo para a morte do paciente, neste último caso, se a espécie for viscerotrópica.

1.4 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Devido às diferenças geográficas, epidemiológicas e clínicas da forma tegumentar, ela vem sendo classificada em: Leishmaniose tegumentar do Velho Mundo e Leishmaniose tegumentar americana (LTA) (Grimaldi et al., 1989). A LTA está presente principalmente na América do Sul, com exceção do Chile e do Uruguai, e também no sul dos Estados Unidos. No Brasil, a doença está presente em todos os estados, e atualmente as regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e a região Amazônica têm sofrido surtos epidêmicos (Gontijo & Carvalho, 2003). Sua incidência é inversamente proporcional ao PIB per capita (Moddaber et al., 2007).

No Brasil, sete espécies foram identificadas como agentes etiológicos: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, sendo que as três primeiras são as espécies mais prevalentes. Entre todas as espécies, destaca-se atenção para as espécies *L. (V.) braziliensis*, cuja infecção pode

complicar-se e causar a forma mucocutânea da doença, sendo também a mais prevalente no Brasil, e a *L.(L.) amazonensis* que pode causar a forma difusa da doença (MS, 2007).

O ciclo de transmissão está associado originalmente às áreas florestais, mas o parasita têm se adaptado ao ambiente doméstico, o que dificulta estratégias específicas para o controle (Laison, 1983). As espécies de vetores que estão envolvidas no ciclo de transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei*. As espécies de *Leishmania* exibem preferências para espécies particulares de flebotomíneos, embora isso não seja absolutamente específico (MS, 2007).

Infecções por leishmânias que causam a forma tegumentar da doença foram descritas em animais silvestres, sinantrópicos e domésticos. Entre os animais domésticos, estão os cães, gatos e cavalos. Como as infecções estão aumentando no ambiente doméstico e tem-se observado altas taxas de infecção nesses animais, acredita-se que eles possuam papel de reservatórios da doença (Reithiger et al., 1999).

A LTA divide-se principalmente nas seguintes formas clínicas:

a) Forma inaparente ou assintomática:

Refere-se aos casos de indivíduos que foram infectados por *Leishmania*, mas que não desenvolveram a doença. O teste de Montenegro, que é um teste cutâneo de hipersensibilidade feito com antígenos de *Leishmania*, pode ser positivo nos pacientes com essa forma. Já foi observada, em área endêmica, uma prevalência de 10% de indivíduos saudáveis, com o teste de Montenegro positivo (Follador et al., 2002; Fagundes et al., 2007).

b) Leishmaniose linfonodal ou ganglionar:

Refere-se ao acometimento dos vasos linfáticos e linfonodos sem o aparecimento de lesões cutâneas. São causadas por parasitos do subgênero *Viannia* como *L. (V.) braziliensis* (Barral et al., 1992; Harms et al., 2001).

c) Leishmaniose cutânea (LC):

c.1) LC localizada é a forma mais freqüente. No Brasil, é causada principalmente pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. A lesão típica é uma úlcera cutânea com borda elevada em moldura, podendo ou não ser acompanhada de linfadenopatia regional ou linfangite patente. O período de incubação varia de 10 a 60 dias. No local de inoculação das promastigotas infectantes pelo flebotomíneo, surge uma pápula eritematosa que se torna firme e, na maioria dos casos, sofre ulceração (Marzochi, 1992). As lesões normalmente são únicas ou em pequeno número, e acometem de forma mais comum as áreas expostas. As lesões podem evoluir para a cura espontânea em até 50% dos casos e geralmente evoluem com boa resposta ao tratamento específico (Cubba, 1984). Na Região

Norte, as lesões múltiplas são freqüentemente causadas por *L. (V.) guyanensis*, e parecem estar relacionadas às múltiplas picadas do vetor flebotomíneo (MS, 2007).

c.2) LC disseminada: As espécies relacionadas causadoras dessa forma são: *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. É uma forma rara, acometendo por volta de 2% dos casos, cujo quadro caracteriza-se por numerosas lesões papulosas, ulceradas ou acneiformes distribuídas pelo corpo. Em geral, ela é definida quando há mais de 10 lesões sobre várias regiões do corpo. No período inicial da doença, o paciente possui uma ou mais lesões primárias localizadas e, em poucos dias, ocorre progressão da doença com o aparecimento de lesões distantes do local inicial da picada (Carvalho et al., 1994).

c.3) LC difusa: É uma das formas mais raras e está situada no pólo anérgico da doença, ou seja, ocorre falta de imunidade mediada por células específica ao parasita. Possui como agente etiológico no Brasil somente a *L. (L.) amazonensis*. A distribuição geográfica abrange a Amazônia (Pará, Amazonas e Maranhão), Bahia, Goiás e Minas Gerais, mas também foi descrito recentemente um caso autóctone no Rio de Janeiro (Azeredo-Coutinho et al., 2007). O início da doença é lento, apresentando-se uma lesão localizada que não responde ao tratamento e evolui progressivamente para a forma difusa. Caracteriza-se pela formação de placas infiltradas e nódulos pelo corpo inteiro, sem ulceração ou acometimento mucoso. A resposta terapêutica é pobre ou ausente.

c.4) LC recidivante (recidiva cútis): Trata-se da recidiva da leishmaniose cutânea, que em geral se inicia na borda de cicatriz de lesão que foi curada. Caracteriza-se por pápulas ou tubérculos da cor da pele ou hiperemiadas, com sinais de inflamação e descamação, localizadas na periferia da cicatriz antiga, a recorrência surge dentro de um ano após a cura da doença inicial (Saravia et al., 1990).

d) Leishmaniose mucosa e mucocutânea (LM):

Tem como característica principal a destruição tecidual progressiva associada à intensa resposta inflamatória nas mucosas do nariz, faringe, palato, lábio superior e laringe (Amato et al., 2003). No Brasil, o principal agente etiológico causador dessa forma é a *L. (V.) braziliensis*. Cerca de 1 a 10% dos pacientes infectados por esta espécie desenvolvem a forma mucosa. A LM apresenta uma resposta imune celular exacerbada, ocorrendo grande perda tecidual e baixa carga parasitária (Carvalho et al., 1994). Geralmente, as lesões mucosas surgem depois da cura espontânea ou com um tratamento ineficiente da úlcera cutânea. A maioria dos pacientes apresenta cicatriz indicativa de LC anterior. Em alguns indivíduos com LM, não se encontra a presença de cicatriz de lesão antiga; esta situação foi denominada LM indeterminada. Supõe-se que estes indivíduos tenham tido uma lesão cutânea fugaz, passando despercebida. Existem também casos em que a infecção iniciou na semimucosa exposta,

como no lábio, denominando-se LM primária. Já em outros dois casos, verificam-se lesões cutâneas e mucosas, caracterizando a mucocutânea concomitante ou por contigüidade com lesão de pele que se estende à mucosa (Marzochi, 1992).

1.5 TRATAMENTO E PROFILAXIA

O diagnóstico da LTA compreende a associação de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, já que os sinais e sintomas clínicos não são patognômicos para fechar o diagnóstico. As lesões podem ser confundidas com as de úlceras tropicais, impetigo, hanseníase, sífilis terciária, boubá, blastomicose, câncer de pele, etc. (Singh, 2006). O diagnóstico laboratorial se divide em três grupos de exames: parasitológicos, imunológicos e moleculares.

Para o diagnóstico parasitológico, os espécimes são obtidos através da escarificação ou biópsia de lesão. Também pode ser feita a punção aspirativa caso houver necessidade de investigação de comprometimento ganglionar primário. No exame parasitológico direto, é realizada a pesquisa de formas amastigotas em lâminas de impressão por aposição de material proveniente de biópsia, ou diretamente em lâmina com material proveniente de escarificação e punção aspirativa, corados pela técnica de Giemsa ou Leishman. O exame parasitológico indireto visa o isolamento do agente infeccioso em meios de cultivo apropriados, como o NNN, Schneider ou BHI. Pode-se inocular o material suspeito em animais de laboratório, sendo o hamster e o camundongo da linhagem Balb/c, os animais de escolha. Esse último método é utilizado em instituições de pesquisa, e não constitui um método prático de diagnóstico pelo fato da evolução da infecção levar meses. Alguns estudos têm sido realizados a fim de implementar outras metodologias auxiliares, como a imunohistoquímica e o PCR, através da detecção de parasitos nas lesões ativas (MS, 2007).

Os testes imunológicos incluem a intradermorreação de Montenegro (IDRM), a qual se baseia no desenvolvimento de reação de hipersensibilidade tardia específica ao antígeno de *Leishmania* inoculado intradermicamente, a imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (Salman et al., 1999).

Para o tratamento da LTA, o Ministério da Saúde preconiza a utilização do antimonial pentavalente (antimoniato-N-metil-glucamina) como droga de primeira escolha. A anfotericina B é considerada droga de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial ou na impossibilidade de seu uso, porém apresenta maior potencial tóxico do que a droga de primeira escolha. Há uma necessidade urgente no desenvolvimento de novos tratamentos para a doença, devido aos efeitos colaterais e danos ao organismo que as drogas atualmente disponíveis causam ao paciente. Além disso, o custo do

tratamento com antimoniais é alto: estima-se que o governo gaste aproximadamente dois milhões e meio de dólares para tratar trinta e cinco mil pacientes (Modabber et al., 2007).

Para evitar a transmissão das leishmanioses, propõem-se medidas de prevenção focadas no controle do vetor e controle da infecção dos animais que possuem papel de reservatório da doença. Entre as medidas viáveis estão: a utilização de inseticidas em ambientes domésticos de área endêmica, utilização de repelentes onde os vetores possam ser encontrados, uso de mosquiteiros de malha fina, limpeza de quintais, terrenos e abrigos de animais domésticos, para impedir que haja a formação de criadouros de flebotômios, e destino adequado do lixo orgânico, para que se evite a aproximação de mamíferos que podem ser fonte de infecção para os flebotomos. Como o cão é um importante reservatório doméstico, tem-se usado com sucesso colares impregnados com inseticidas para se evitar a infecção, pois o tratamento de animais doentes não é uma medida aceita, já que pode conduzir ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento de casos humanos (Reithinger et al., 2004).

O controle da doença é considerado complexo por vários motivos, mas principalmente porque o parasito se mantém em um ciclo silvestre primário de transmissão, justificando o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura que possa vir a ser usada nos humanos e também em animais domésticos. O desenvolvimento de uma vacina é considerado por muitos autores a melhor alternativa para o controle da doença e com melhor custo/benefício. No entanto, não existe atualmente uma vacina contra *Leishmania* licenciada para uso humano no mundo. Várias preparações de vacinas estão sendo testadas e encontram-se em estágio de desenvolvimento mais ou menos avançado (Handman, 2001). Atualmente, duas vacinas desenvolvidas contra a leishmaniose visceral foram licenciadas no Ministério da Agricultura e liberadas comercialmente para uso veterinário: a Leishmune® (<http://www.fordodge.com.br>) e a LeishTech® (<http://www.hertapecalier.com.br>).

1.6 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE.

A habilidade do parasito em invadir e se replicar no interior de macrófagos tem sido alvo de vários estudos científicos. A multiplicação e sobrevivência ocorrem no interior de macrófagos quiescentes, e a morte está ligada ao processo de ativação destas células. A consequência da infecção é determinada pela natureza e magnitude de respostas imunes de células T e de citocinas na fase inicial da infecção (Reed & Scott, 1993).

O processo imune começa logo após o repasto sanguíneo, quando o flebotômio regurgita entre 100 a 1.000 promastigotas na derme do hospedeiro. Para sobreviver, os

parasitos devem resistir à exposição aos componentes do soro e à destruição pelas células do sistema imune inato que são residentes ou recrutadas para a pele. A pele é um órgão imunológico complexo na qual múltiplas células do sistema imune inato protegem o hospedeiro de patógenos infecciosos (**Tabela 1.1**). A pele normal de adultos contém um número substancial de células T, quase o dobro de células presentes na circulação, conferindo papel importante na resposta imune local (Clark et al., 2006).

As formas metacíclicas regurgitadas entram rapidamente em contato com componentes do soro, ocorrendo a ligação de moléculas do sistema complemento e ativação das vias clássica e alternativa, mas resistem à lise pelo complemento devido à presença de cadeias de LPG mais alongadas em suas superfícies, em comparação às outras formas não metacíclicas (Mosser & Brittingham, 1997; Bogdan & Rollingshoff, 1998). As ligações de C3bi e outras moléculas do complemento à superfície do parasito levam à opsonização, promovendo a fagocitose. Muitas células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos, chegam ao local da invasão do parasito, atraídas pelas moléculas do complemento e por quimiocinas liberadas no local (MIP-1 e MIP-2). Os macrófagos possuem uma variedade de mecanismos de defesa contra patógenos intracelulares, dentre eles a produção de intermediários reativos do oxigênio (IROs) e do nitrogênio (IRNs). Apesar de serem suscetíveis a estas moléculas, os parasitos desenvolveram uma variedade de mecanismos para lidar com o *stress* oxidativo, dentre eles a inibição da atividade PKC e a produção de enzimas, como a tripanotona e arginase (Moreira et al., 2009). Esta última é capaz de competir e interferir nas vias de utilização de L-arginina das células hospedeiras, levando à depleção de L-arginina (necessária para a produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase), com consequente diminuição da produção de óxido nítrico e aumento da produção de poliaminas (como a espermidina), essenciais para o crescimento e diferenciação dos parasitas (Vincendeau et al., 2003; Colotti et al., 2011).

Tabela 1.1.: Células do sistema imune inato e seus papéis na Leishmaniose murina. (Adaptada de Nylén & Gaudam, 2010)

Célula da imunidade inata	Função geral	Observações na leishmaniose murina
Queratinócitos (epiderme)	Sensores de injúria e infecção	Não esclarecido
Células de Langerhans (epiderme)	Apresentação antigênica, indução de tolerância periférica, indução de Th2, <i>cross-priming</i> de T CD8+.	Função desconhecida; não é necessária para indução de resposta Th1.
Células dendríticas (derme)	Vigilância do sistema imune, apresentação antigênica, apresentação cruzada às células T CD8+	Sensores de infecções
Macrófagos (derme)	Atividade antimicrobiana e produção de mediadores pró e anti-inflamatórios	Células hospedeiras
Células dendríticas plasmocitóides (pDC)	Produção de IFN- α , ativação de células T, B, NK e dendrítica mielóide	Capazes de induzir a imunidade protetora
Mastócitos	Regular a resposta inflamatória pelos neutrófilos	Células “sentinelas” contribuem para o recrutamento de células dendríticas. Também relacionadas à patologia e suscetibilidade.
Células dendríticas inflamatórias derivadas de monócitos (derme inflamada)	Células inflamatórias, estimulação de célula T, produção de IL-12, iNOS e TNF- α	Indução da imunidade protetora. São células hospedeiras nas fases tardias da doença (no camundongo resistente)
Neutrófilos Polimorfonucleares	Destruição de patógenos	Hospedeiros temporários de <i>Leishmania</i> ; Função protetora ou relacionados à patologia na fase tardia da doença.
Células Natural-Killer (NK)	Fonte inicial de IFN- γ	Contribui para a resistência inicial contra o parasito

Outro mecanismo de evasão utilizado para o estabelecimento da infecção é através da entrada em granulócitos. Os neutrófilos estão entre os primeiros tipos celulares que são

infectados pela *Leishmania*, e essa infecção desencadeia a liberação de substâncias que atraem os macrófagos. Eles, por sua vez, fagocitam e produzem a citocina anti-inflamatória TGF- β . (Stebut et al., 2003).

Quando o sistema de evasão é bem sucedido e a imunidade inata não consegue controlar a infecção e a multiplicação do parasito, cabe a resposta imune adaptativa cumprir esse papel. A resposta imune adaptativa consiste no reconhecimento do antígeno, ativação dos linfócitos específicos, fase efetora, apoptose de clones efetores e manutenção de células de memória imunológica (Abbas & Lichtman, 2003). Para que a resposta imune adaptativa entre em ação, uma célula da imunidade inata deve realizar a apresentação antigênica para um linfócito T virgem, que reconhece especificamente o antígeno. O sinal para ativação depende da ligação do complexo antígeno e MHC de classe I ou II da célula apresentadora de antígeno (APC) com o receptor TCR do linfócito T CD8 ou CD4, respectivamente. Como a *Leishmania* é um parasito intracelular residente dos vacúolos parasitóforos de células fagocíticas, o antígeno do parasito é comumente processado para ser apresentado para os linfócitos CD4, via MHC classe II. Ainda não se sabe exatamente como os linfócitos CD8 são ativados pela via de apresentação por MHC de classe I, particularmente como os conteúdos do vacúolo parasitóforo alcançam o citosol, e são degradados pelo proteasoma e transportados para o retículo endoplasmático, onde os peptídeos se ligam às moléculas de MHC classe I; mas sabe-se que a participação dos linfócitos CD8 é de grande importância na proteção e cura da doença, através da produção de IFN- γ e pela atividade citotóxica, levando à morte os macrófagos infectados (Rostami et al., 2010).

Um segundo sinal é provido por moléculas co-estimulatórias, as mais comuns sendo B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que são expressas nas APC e se ligam à CD28 na superfície da célula T. A ligação do B7 ao CD28 emite sinais para o linfócito, que induz a expressão de moléculas anti-apoptóticas e estimulam a produção de fatores de crescimento e outras citocinas (como IL-2), promovendo a ativação e sobrevivência dos linfócitos T. Uma vez ativadas, as células T expressam proteínas que contribuem para a sustentação ou modificação dos sinais co-estimulatórios (Bour-Jordan & Bluestone, 2002; Sharpe & Freeman, 2002).

A partir deste ponto, a evolução da infecção pode tomar vários rumos, dependendo dos tipos de células, da qualidade da resposta mediada por citocinas envolvidas na resposta imune e da espécie de *Leishmania* envolvida no processo patogênico, que como mencionado anteriormente, estão diretamente relacionados com o tipo de manifestação clínica.

Por vários anos, estudos em modelos animais têm ajudado a elucidar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos durante a resposta imune contra *Leishmania* sp., e têm mostrado a importância de vários fatores que influenciam a progressão da doença após a

infecção (Requena et al., 2004). Os fatores variam entre a cepa do parasita infectante, o método de inoculação e a genética do hospedeiro. Apesar dos resultados obtidos com animais em relação aos fatores imunológicos e os mecanismos envolvidos na complexa interação parasito-hospedeiro, não se deve extrapolar e interpretar totalmente esses resultados para os seres humanos, devido às diferenças intrínsecas que existem entre os sistemas (Sacks & Noben-Trauth, 2002; Gollob et al., 2008). A vantagem de se utilizar camundongos para estudos de resposta imune é a facilidade de manutenção dos animais em laboratório e de manipulação genética, levando ao desenvolvimento de linhagens de camundongos *knock-out* para genes de interesse (Mestas & Hughes, 2004).

Vários grupos vêm se dedicando ao estudo de modelos experimentais filogeneticamente mais próximos ao homem, sendo os primatas não humanos do Velho Mundo os mais estudados (Marques da Cunha, 1994; Lainson & Shaw, 1977; Lainson & Bray, 1966; Amaral et al., 1996; Teva et al., 2003; Porrozzzi et al., 2006). Estes animais apresentam evolução clínica muito semelhante à doença humana (tanto nas leishmanioses do Velho Mundo, como nas do Novo Mundo), e são uma ferramenta importante, não só para se estudar a imunopatologia da infecção, como também para o estudo de antígenos candidatos vacinais (Amaral et al., 2002; Grimaldi, 2008; Porrozzzi et al., 2006). Infelizmente, torna-se necessária uma estrutura dispendiosa e complexa para manutenção dos animais em condições aceitas pelos comitês de ética em pesquisa, o que inviabiliza sua utilização em países com menos recursos (Gibbs et al., 2007; Nikolich-Zugich, 2007; Souza-Lemos et al., 2008).

O papel relevante das citocinas envolvidas na resposta imune contra *Leishmania* tem sido confirmado a partir de experimentos feitos em camundongos transgênicos e utilizando anticorpos anti-citocinas, ou anti-receptores de citocinas. Observam-se dois padrões de respostas imunes entre as linhagens de camundongos: os animais C57BL/6 e C3H apresentam-se resistentes à infecção, pois montam uma resposta imune predominantemente do tipo 1 (*T helper 1*), com alta produção de IFN- γ , enquanto os camundongos da linhagem Balb/c, falham no controle da infecção e desenvolvem lesões progressivas e doença sistêmica, respondendo com alta produção de IL-4 por células Th2. Experimentos em camundongos Balb/c *knock-out* para o gene IL-4, e em camundongos tratados com anticorpo anti-IL-4, que eram capazes de curar a infecção (Sadick et al., 1990; Chatelain et al., 1992) demonstraram que a produção de IL-4, na fase inicial da infecção, direciona a diferenciação de células T CD4⁺ virgens, em células Th2. Por outro lado, camundongos naturalmente resistentes *knock-out* para IL-12, passaram a adquirir o perfil de suscetibilidade assim como os camundongos suscetíveis, depois de tratados com IL-12, tornam-se resistentes à infecção (Morhs et al., 1999).

Para que a resposta imune se inicie, a APC, na maioria das vezes uma célula dendrítica, deve fazer apresentação antigênica para a célula T CD4. A interação das moléculas co-estimulatórias com seus respectivos ligantes (CD40-CD40L, OX40-OX40L, CD80-CTLA4/CD28), junto com o ambiente de citocinas presentes no local, promove a diferenciação da célula T virgem em célula Th1 ou Th2. Na resposta imune do tipo Th1, a célula dendrítica pode ser ativada pela ligação de seu receptor do tipo *Toll* (TLR) com um padrão molecular associado à patógeno (PAMP), passando a produzir IL-12, assim promovendo a diferenciação de células CD4 Th1 e as moléculas STAT-1 e STAT-4 são ativadas, e levam à produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 pelo fator de transcrição T-bet (Szabo et al., 2002). Na resposta imune do tipo Th2, a inabilidade do antígeno ativar a célula dendrítica a produzir IL-12, resulta na diferenciação de células produtoras de IL-4. Além disso, os antígenos e o próprio ambiente tecidual podem induzir a célula dendrítica a produzir IL-4 ou IL-10. STAT-6 é ativada especificamente pelo receptor de IL-4, ocorrendo a liberação do fator de transcrição GATA-3, e conseqüentemente a produção de citocinas da resposta imune do tipo Th2, como IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- β . Por outro lado, Bcl-6, ROG (repressor de GATA) e FOG1 regulam negativamente a diferenciação de Th2, através da inibição da atividade de STAT6 e GATA1. A família SOCS, supressoras de citocinas, inibem as respostas imunes Th1 e Th2, através do bloqueio da atividade de STAT (**Figura 1.1**) (Sacks & Noben-Trauth, 2002).

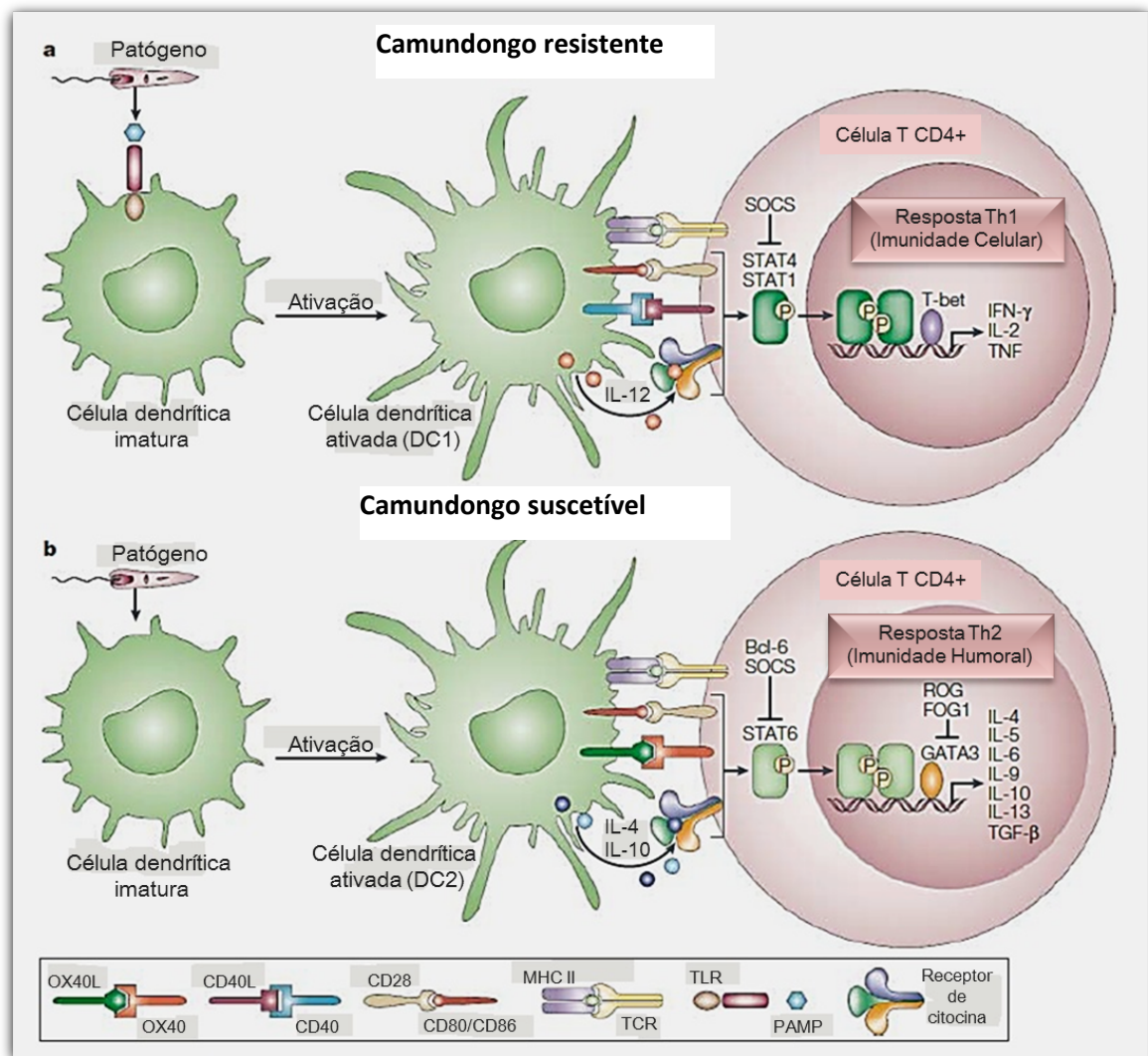


Figura 1.1.: Modelo murino do desenvolvimento das respostas imunes dos tipos Th1 e Th2 por *Leishmania (L.) major*. Sacks & Noben-Trauth, 2002.

TNF- α é uma citocina típica da resposta imune Th1, e é produzida por macrófagos ativados, linfócitos T, células NK, além de outros tipos celulares. Nos modelos de infecção por *Leishmania*, TNF desempenha um papel na proteção contra os parasitos, agindo em sinergismo com IFN- γ . Acredita-se que o seu efeito protetor deve-se à habilidade de ativar os macrófagos, controlando a carga parasitária. Carrier e colaboradores (1990) observaram que o tratamento com anticorpo anti-TNF tornava as lesões maiores nos camundongos geneticamente resistentes, em relação ao grupo que não recebeu o tratamento. Em humanos, existem relatos de casos em que pacientes com artrite reumatóide, tratados com antagonistas de TNF, tiveram a recorrência dos sintomas clínicos de leishmaniose (Franklin et al., 2009; De Leonardis et al., 2009).

Até pouco tempo atrás, achava-se que a IL-10 não era importante no estabelecimento da infecção por *Leishmania*, já que o tratamento de camundongos BALB/c com anticorpos

monoclonais anti-IL-10 não tinha um efeito marcante na regressão da infecção (Chatelain et al., 1999). Estudos, como o realizado por Belkaid e colaboradores (2001), demonstraram a importância desta citocina no estabelecimento da infecção por *Leishmania (L.) major*, e na persistência parasitária, e sugeriram que a IL-10 poderia estar atuando como inibidora dos possíveis efeitos protetores gerados por IFN- γ , através do bloqueio da secreção de IL-12 por macrófagos ativados e células dendríticas. Por outro lado, IL-10 pode atuar como citocina homeostática, regulando a produção exacerbada de IFN- γ . Este efeito foi observado em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com a forma cutânea da doença (Bacellar et al., 2002).

Os fenótipos Th17 e Treg vêm sendo muito bem estudados, e parecem possuir importantes funções na indução e no controle da resposta inflamatória, respectivamente (Korn et al., 2009; Anderson et al., 2005). As células CD4⁺ regulatórias são divididas em duas categorias: células regulatórias naturais FOXP3⁺ (CD4⁺CD25^{high}), oriundas do timo, e células regulatórias induzidas por antígeno, que são geradas na periferia (ex. Tr1 e Th3). Este segundo tipo pode ou não expressar FOXP3. Todos os dois tipos são fontes de IL-10 e participam na resposta anti-inflamatória, impedindo o dano tecidual, e a falta dessas células tem sido relacionada à doenças autoimunes (Kane & Mooser, 2001). No modelo murino de doença crônica de leishmaniose, notou-se que células Th1 produtoras de IFN- γ podem ser fontes de IL-10, atuando como um mecanismo de auto-regulação para minimizar a imunopatologia mediada pelas células T (Anderson et al., 2005). Nos seres humanos, as células CD4⁺ CD25^{high} regulatórias são encontradas nas lesões cutâneas, e células FOXP3⁺ e IL-10 intralesionais têm sido associados à falta de resposta ao tratamento na infecção por *L. (L.) amazonensis* (Bureau et al., 2009)

As células Th17 são células T *helper* pró-inflamatórias que produzem a citocina IL-17, com capacidade de induzir recrutamento, migração e ativação de neutrófilos. Têm-se observado que esta citocina participa na proteção de epitélios contra bactérias extracelulares e fungos, mas também estão envolvidas com imunopatologias graves (Korn et al., 2009). Na leishmaniose experimental, as células Th17 têm sido associadas com a destruição tecidual, pois os camundongos Balb/c deficientes para a citocina apresentam lesões menores e com menos neutrófilos, em comparação às lesões de camundongos normais. Já níveis elevados dessa citocina não conferiram diminuição da carga parasitária (Lopez et al., 2009).

O modelo convencional de infecção subcutânea por *L. (L.) major* utiliza alta carga parasitária (até 10⁷ por inóculo) em relação ao número de parasitos regurgitados normalmente pelo flebotomíneo, geralmente na fase estacionária de cultura e inoculados por via subcutânea (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Outras variáveis têm sido introduzidas ao modelo, e em

alguns casos, alterando os padrões de resposta imune e de patologia pré-estabelecidos, elas podem envolver o estágio do desenvolvimento dos parasitos (formas promastigotas metacíclicas purificadas ou promastigotas de fase estacionária), carga parasitária mais baixa (10 a 1.000 parasitas), rotas alternativas de inoculação (vias intradérmica, intravenosa, intranasal) e infecção natural através da picada do vetor flebotomíneo infectado (Sacks et al., 1984; Bretscher et al., 1992; Nabors et al., 1995; Kanhawi et al., 2000).

Vale ressaltar também que, no modelo de infecção subcutânea, nem sempre os camundongos C57Bl/6 e Balb/c são respectivamente resistentes e suscetíveis à infecção por todas as espécies de *Leishmania*. Na infecção por *L. (V.) braziliensis*, ambas as linhagens são resistentes, não ocorrendo o desenvolvimento de lesões progressivas. Já a infecção por *L. (L.) amazonensis*, ambas as linhagens são suscetíveis, tendo sido observado no camundongo C57Bl/6 supressão das citocinas TNF- α e IL-12, incluindo a inibição da maturação de células dendríticas e produção de quimiocinas por elas (Maioli et al., 2004).

O paradigma Th1/Th2 não tem se mostrado capaz de explicar a imunopatologia da cura e progressões das infecções no modelo murino, nem mesmo na infecção por *L. (L.) major*. Surpreendentemente, Sacks e colaboradores (2005) demonstraram uma infecção com lesões progressivas com alta carga parasitária no camundongo C57Bl/6 por *L. (L.) major* proveniente de um paciente que não se autocurou, e a resposta imune predominante nesses camundongos foi Th1. A caracterização bem definida dos papéis das respostas imunes dos tipos Th1 e Th2 também é controversa para espécies do Novo Mundo, como na infecção por *L. (L.) amazonensis*. Alguns estudos indicaram que um fenótipo Th1 predominante de células T CD4⁺ pode não ser um indicativo de proteção contra a infecção (Vanloubbeek & Jones, 2004).

1.7 A OS PERFIS Th1/Th2 NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

O paradigma Th1/Th2 do desenvolvimento imunológico durante a infecção por *Leishmania* foi inicialmente determinado usando como espécie modelo, *L. (L.) major* (Scott et al., 1988). Este paradigma, no entanto, não tem se mostrado capaz de explicar as manifestações clínicas da LTA, nem a imunopatologia das infecções do modelo murino com as diversas espécies de *Leishmania*. Em humanos, a resposta imune não é tão evidentemente polarizada como nesse modelo; ela varia entre a forma clínica e a espécie que causou a infecção. Por exemplo, se a infecção cutânea humana causada por *L. (V.) braziliensis* tiver uma resposta imune do tipo Th1 exacerbada, com grande produção de IFN- γ , ocorrerá o agravamento da patologia com o aparecimento das lesões mucosas (Gollob et al., 2008).

Na LC, pode ser observada uma positividade ao teste cutâneo *in vivo* (IDRM) e aos testes *in vitro*, como a proliferação de linfócitos frente aos antígenos de *Leishmania*. Em

pacientes com menos de dois meses de evolução, parece ocorrer uma depressão transitória da resposta imune Th1, caracterizada pela baixa resposta proliferativa de linfócitos (RPL) e baixa produção de IFN- γ pelas PBMC, possivelmente devido à modulação da resposta imune do tipo Th1 ocorrida durante as fases precoces da infecção (Rocha et al., 1999). Porém, encontra-se um predomínio das citocinas do tipo Th1 e uma resposta imune específica ao parasito bem modulada em fases posteriores da doença. A LC pode ser considerada uma doença benigna que, na maioria dos casos, resolve-se mesmo sem um tratamento específico (Da Cruz & Pirmez, 2005). Na LC, sabe-se que pacientes com menor capacidade de montar uma resposta imune celular eficaz, tendem a evolução clínica e resposta terapêutica menos favoráveis (Mendonça et al., 1986). Em pacientes coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), a LC pode apresentar quadros clínicos atípicos, tendência à disseminação e má resposta à quimioterapia (Mota-Sasaki et al., 1997). Em uma área endêmica de leishmaniose causada por *L. (V.) braziliensis*, foi observado que o tamanho das lesões dos pacientes correlacionava com maior frequência de células ativadas (CD69 e CD40L) e maior produção de citocinas inflamatórias específicas pós-estimulação com antígeno solúvel (Antonelli et al., 2005).

Os pacientes com a forma cutânea disseminada apresentam positividade no IDRМ, e nos ensaios de RPL apresentam resultados com maior variabilidade, além de parecer ter uma produção mais alta de IFN- γ e de TNF- α , e baixa produção de IL-5 e IL-10 em comparação aos pacientes com leishmaniose cutânea (Turetz et al., 2002).

Casos raros de pacientes sem causas conhecidas de imunodeficiência podem apresentar uma anergia específica para antígenos de *Leishmania*, que caracteriza a base imunopatológica para o desenvolvimento da leishmaniose cutânea difusa, no qual a deficiência de imunidade específica mediada por células se associa à multiplicação descontrolada do parasito e à disseminação das lesões (Silveira et al., 2004). O exame histopatológico revela, nas lesões, um acentuado infiltrado celular composto principalmente por macrófagos contendo numerosas formas amastigotas. O IDRМ é caracteristicamente negativo, assim como os testes de RPL e produção de IFN- γ em culturas de PBMC estimuladas com antígenos de *Leishmania*. Estes pacientes respondem *in vitro* com uma baixa produção de IFN- γ e níveis altos de IL-10 (Silveira et al., 2004). Os níveis de anticorpos totais anti-leishmania são altos, apesar da falta de resposta imune celular. A resposta ao tratamento é ruim, e isto provavelmente se deve à imunodeficiência específica. Embora estes pacientes apresentem redução significativa das lesões durante a quimioterapia, as recidivas são praticamente inevitáveis. Durante estes períodos de remissão clínica, há um aumento da expressão de IFN- γ , e uma diminuição da expressão de IL-10, mas ambos os

fenômenos são transitórios, desaparecendo na recidiva pós-tratamento (Bomfim et al., 1996).

A LM está situada no pólo hiperérgico-pauciparasitário da doença, caracterizada por uma resposta imune intensa e pouca carga parasitária (Silveira et al., 2004; Bacellar et al., 2002). A IDRМ dos pacientes é fortemente positiva, com endurações muitas vezes superiores às dos pacientes de LC, podendo até ocorrer necrose tecidual. Eles também possuem maior produção das citocinas do tipo Th1 (IFN- γ e TNF- α), comparados aos pacientes com LC. Os níveis de IL-10 e TGF- β são muito baixos, não ocorrendo assim a modulação da resposta imune inflamatória e inativação dos macrófagos, e sendo assim, foi sugerido que a incapacidade de promover uma modulação adequada da resposta inflamatória possa estar envolvida na patogênese da LM (Bacellar et al., 2002). Um outro grupo também encontrou maior frequência *in vitro* de células produtoras de IFN- γ na LM em relação à LC porém, não encontrou diferenças significativas entre a frequência de células que produziram IL-10. Os mesmos autores encontraram uma menor expressão *in situ* de receptor para IL-10 em pacientes de LM (Faria et al., 2005).

Através de estudos *ex vivo*, foi encontrada uma maior frequência de células ativadas na LM, em comparação à LC e, além disso, os monócitos de pacientes com LM após estimulação com antígeno solúvel, não apresentaram correlação positiva entre IL-10 e TNF- α como os pacientes com LC, o que possivelmente poderia levar a uma deficiência do controle inflamatório *in vivo* (Gaze et al., 2005). Ainda que se considere que na LM predomina a resposta imune do tipo Th1 (inflamatória), estudos anteriores identificaram nas mucosas um perfil misto de citocinas Th1 e Th2 (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998; Amato et al., 2003).

Embora a resposta imune que se desenvolve na LM não seja capaz de controlar a doença, e provavelmente seja responsável pelas manifestações clínicas, ela é capaz de conter a multiplicação parasitária, já que os parasitas são bastante escassos nas lesões mucosas (Caceres-Dittmar et al., 1993; Pirmez et al., 1993).

Um grupo que merece atenção para estudos é o de indivíduos que foram infectados, e não desenvolveram a doença. Presume-se que estes indivíduos são capazes de montar uma resposta imune eficiente e neles, encontrou-se uma forte correlação direta entre a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10 (Gomes-Silva et al., 2007). Segundo Bittar e colaboradores (2007), a ausência de doença nos indivíduos infectados assintomáticos pode ser explicada pela sua habilidade em criar um equilíbrio entre citocinas imunoregulatórias (IL-10) e efetoras (IFN- γ), levando à destruição dos parasitos, sem provocar dano tecidual.

1.8 VACINAS NA LEISHMANIOSE

A recuperação da infecção ativa em seres humanos pela LC do Velho Mundo, e também em camundongos, está associada ao desenvolvimento de imunidade forte e duradoura contra uma segunda infecção. A proteção desenvolvida, após a infecção natural, foi o primeiro indício de que células T de memória são induzidas após a recuperação da doença (Moddaber, 1989). A partir dessa observação, acredita-se que o desenvolvimento de uma vacina eficaz que proteja contra a infecção natural seja possível.

Um professor da Universidade Hebreus de Jerusalém desenvolveu a primeira vacina contra a leishmaniose, observando uma prática comum entre as mães libanesas (Gavron & Saul, 1997). Elas expunham regiões do corpo de seus filhos, como o braço, às picadas dos flebotomíneos, pois intuitivamente sabiam que uma lesão que se autocurava, os protegeria de desenvolver lesões em áreas menos estéticas no futuro e lesões mais graves (Gavron & Saul, 1997). Passaram-se, então, a inocular material de lesões e, mais tarde, parasitos mantidos em cultura, em regiões do corpo cobertas dos indivíduos não infectados (Nadim et al., 1983). Esta prática, chamada de Leishmanização, foi descontinuada devido a problemas como: lesões crônicas que não se curavam, aparecimento do HIV, uso de drogas imunossupressoras, dificuldade na padronização do inóculo, persistência parasitária e por razões éticas. No presente, a prática é limitada a uma vacina registrada no Uzbequistão (Kamesipour et al., 2006).

Uma vacina ideal contra a leishmaniose deve ser segura, acessível para a população de risco, indutora de resposta imune celular, eficiente contra as espécies causadoras da forma tegumentar e visceral, estável à temperatura ambiente, ter potencial profilático e terapêutico. Entre os atributos mencionados acima, os mais difíceis de serem alcançados são a imunidade cruzada contra as diferentes espécies e a indução e manutenção da resposta imune. Apesar da existência de um número cada vez maior de informações relacionadas com a genética e a biologia do parasito, assim como sobre a imunologia experimental e clínica destas doenças, um dos maiores desafios continua sendo a tradução dos dados do modelo animal para a doença humana, e a transição do laboratório para o campo (Kedzierki et al., 2006).

As vacinas contra leishmaniose podem ser divididas em:

- Vacinas compostas por promastigotas vivos, incluindo parasitos geneticamente modificados;
- Vacinas de primeira geração, compostas por parasitos inteiros mortos, ou extratos não caracterizados de antígenos do parasito;
- Vacinas de segunda geração, que incluem as vacinas de DNA ou de antígenos recombinantes obtidos através da tecnologia de DNA recombinante.

Um candidato vacinal é exaustivamente estudado em modelos experimentais e, se apresentar resultados positivos em diversos parâmetros, ele passa a ser avaliado nas fases de estudo clínico em humanos. Ele deve seguir as quatro fases de estudo, até ser liberado para uso humano. Na fase I, segurança e imunogenicidade são estudadas em comparação com um grupo placebo. Os estudos de fase II avaliam imunogenicidade e melhor esquema vacinal quanto à dose, número de aplicações e vias de inoculação. Um estudo de fase III tem como objetivo avaliar a eficácia vacinal na infecção natural. Somente após ser aprovada nestas três fases, a preparação pode ser registrada e industrializada. Posteriormente, estudos de fase IV são conduzidos em um grande número de indivíduos (10.000 a 100.000) em campanhas nacionais de imunização (Modabber, 1995).

A partir da década de 40, Pessoa e colaboradores (1941) começaram a avaliar doses de uma vacina polivalente, que compreendia 18 cepas de *Leishmania* em 1.127 indivíduos sadios. Os estudos com promastigotas mortas foram seguidos pelo grupo de Mayrink, que desenvolveu uma vacina pentavalente, composta por 5 cepas: *Leishmania* (L.) *amazonensis* (MHOM/BR/60/BH6), *Leishmania* (L.) *major-like* (MHOM/BR/73/BH121), *Leishmania* (L.) *major-like* (MHOM/BR/71/BH49), *Leishmania* (L.) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania* (V.) *braziliensis* (MHOM/BR/70/M117619). Esta preparação, denominada Leishvacin®, foi capaz de converter o IDRM em 78,4% dos voluntários vacinados, sem efeitos colaterais, e mostrou indução de uma resposta *in vitro* contra espécies dermatóricas de *Leishmania*, mediada por linfócitos T produtores de IFN- γ , e predomínio do fenótipo T CD8+ (Mayrink et al., 1979; Antunes et al., 1986; Nascimento et al., 1990; Mendonça et al., 1995). Em um estudo de fase III, a vacina foi capaz de proteger contra infecção por *Leishmania*, 70% dos 644 indivíduos imunizados que apresentaram IDRM positivo após a vacinação (Antunes et al., 1986).

Apesar de apresentar resultados promissores, esta vacina candidata possuía problemas na padronização e na sua produção. A Organização Mundial da Saúde sugeriu, então, que os estudos com vacinação deveriam continuar com somente uma cepa. A cepa de escolha foi a de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) por ser bem caracterizada, e pela facilidade de crescimento em cultivo axênico (De Luca et al., 1999). Foi demonstrado que duas doses da vacina, composta por promastigotas mortas, rompidas por sonicação e que continha mertiolato, apresentavam imunogenicidade semelhante à da vacina de cinco cepas (De Luca et al., 2001).

Estudos com a Leishvacin® de cepa única foram realizados na Colômbia e no Equador, e revelaram que a vacina era segura e imunogênica (Vélez et al., 2000), mas não conferiu proteção contra a infecção (Vélez et al., 2005). Como o agente etiológico de

leishmaniose tegumentar que mais prevalece naqueles países não é *L. (L.) amazonensis*, acredita-se que a vacina proteja contra a infecção com o parasito homólogo (Armijos et al., 2003 e 2004). Apesar de resultados controversos em relação à sua capacidade profilática, principalmente devido aos problemas relacionados com o desenho experimental dos ensaios clínicos e a diminuição no número de casos da doença nas áreas de estudo, o potencial da Leishvacin® de cinco, ou mesmo de uma única cepa de *Leishmania*, como vacina terapêutica vem sendo explorado, tendo-se obtido bons resultados em pacientes resistentes à terapêutica usual com antimonial pentavalente (Silveira et al., 1993; Mayrink et al., 2006; Da-Cruz et al., 1999). Preparações semelhantes vêm sendo testadas na Venezuela, em ensaios de imunoterapia, com resultados encorajadores, mesmo em pacientes com estados agravados da forma difusa da doença (Machado-Pinto et al., 2002; Convit et al., 2003 e 2004).

Embora exista um número elevado de estudos com vacinas de primeira geração, não só nas Américas, como no Velho Mundo, até mesmo com resultados positivos, estas preparações estão muito longe de serem liberadas para produção e utilização em larga escala, principalmente devido aos problemas relacionados com sua padronização e estabilidade. Por este motivo, alguns grupos de pesquisa brasileiros estudam a possibilidade de seleção de frações antigênicas, ou mesmo de antígenos definidos, presentes na Leishvacin®, que possam ser utilizados em uma futura vacina (profilática ou terapêutica) mais bem definida contra a leishmaniose tegumentar, ou de um futuro teste diagnóstico (Fernandes et al., 1997; Cardoso et al., 2003; Telino et al., 2006).

Atualmente, mais de 30 antígenos de *Leishmania* já foram, ou estão sendo testados, como candidatos vacinais contra Leishmaniose tegumentar e visceral (de Oliveira et al., 2009). Muitos deles são conservados entre as espécies do parasita, mas, em muitos casos, não são capazes de induzir proteção em ensaios clínicos, ou não induzem proteção contra todas as espécies do parasita causadoras de doença humana (Handman, 2001). Componentes de vacinas com as formas promastigotas mortas ou vivas, possuem a habilidade de estimular o sistema imune inato e, portanto, podem agir como adjuvantes naturais, mas, em contraste os antígenos altamente purificados têm a desvantagem de não possuírem essa habilidade, e por isso muitas vezes requerem adjuvantes para aumentar sua imunogenicidade (Bhowmick & Ali, 2008).

O desenvolvimento de uma vacina tem demonstrado ser um objetivo difícil de ser alcançado, não pela descoberta de moléculas candidatas, já que vários antígenos surgem a cada dia e um número maior ainda deve surgir após o sequenciamento do genoma de diferentes espécies do parasita, mas sim pelas inúmeras dificuldades relacionadas com: o conhecimento ainda incompleto da patogênese do parasita, a complexa resposta imune

necessária para indução de proteção e desenvolvimento de memória imunológica e a ausência de modelos experimentais que possam ser adequados, gerando dados que muitas vezes não são reprodutíveis em seres humanos.

1.9. IMPORTÂNCIA DE ADJUVANTES EM VACINAS.

Os adjuvantes, derivado do latim “*adjuvare*”, e que significa ajudar, são componentes que podem aumentar e/ou modular a imunogenicidade de um antígeno; ou seja, eles induzem uma resposta imune mais potente e persistente, com o benefício de se utilizar menor quantidade de antígenos, e até mesmo, eliminar a necessidade de mais de uma imunização (Guy, 2007).

Após a descrição dos TLR em seres humanos, no final da década de 90 (Medzhitov et al., 1997) e, em associação com o conceito de que a resposta imune adaptativa depende do nível e da especificidade dos “sinais de perigo” (os PAMPs), percebidos pelas células do sistema imune inato após infecção ou vacinação (Iwasaki & Medzhitov, 2004), várias moléculas ligantes para TLR vêm sendo descritas e avaliadas como possíveis adjuvantes (Lahiri et al., 2008). A presença, tanto do antígeno, como de um ligante para TLR, parece ser necessária para que uma perfeita apresentação e ativação do linfócito T antígeno-específico seja alcançada (Blander & Medzhitov, 2006). Tem-se dividido a apresentação antigênica nas seguintes etapas: o sinal 0, em que ocorre o reconhecimento do antígeno e ativação da APC; o sinal 1, que é ativado por apresentação do peptídeo específico pela molécula de MHC para o TCR; e por último, o sinal 2, que consiste na ligação de moléculas co-estimulatórias para que não ocorra anergia ao peptídeo apresentado. O adjuvante pode atuar em cada um dos três sinais (Barr et al., 2006).

Raman e colaboradores (2010) demonstraram que, na leishmaniose experimental, a utilização de um agonista de TLR4 associado à proteína L110f, uma candidata vacinal contra leishmaniose, foi capaz de induzir uma resposta imune celular forte e efetiva, levando à cura das lesões e diminuição da carga parasitária dos camundongos infectados, comparado ao grupo que só foi imunizado com a proteína e o adjuvante puros, demonstrando a ação sinérgica que os adjuvantes podem oferecer junto às proteínas.

Os adjuvantes podem ser compostos por constituintes variados, e possuem diferentes funções e atividades, incluindo função carreadora e/ou imunoestimulante e/ou atividade imunomodulatória (Guy, 2007). O sal de alumínio é o adjuvante mais utilizado em vacinologia para seres humanos, e é forte indutor de resposta imune humoral (Jordan et al. 2004). Atualmente, existe uma necessidade de se descobrir novos adjuvantes que induzam uma resposta imune com caráter celular (Schijns, 2001). Sabe-se que eles podem ativar

seletivamente respostas imunes dos tipos Th1 ou Th2, ou mesmo redirecionarem uma resposta já estabelecida, embora neste último caso, seja mais difícil em indivíduos primados, do que nos não sensibilizados. Esta abordagem tem sido utilizada para reverter a alergia humana, caracterizada por resposta imune do tipo Th2, utilizando agonistas de Th1 (como MPL), ou acoplando o alérgeno à oligonucleotídeos CPG (Drachenberg et al., 2001; Creticos et al., 2006).

Como anteriormente referido, há diversas moléculas candidatas para compor uma vacina contra a leishmaniose. Talvez seja a hora de focar atenção na avaliação de novas formas de apresentação de antígenos conservados já existentes, utilizando-se substâncias capazes de elicitar uma resposta imune desejada, através de agonistas de TLR, ou mesmo com ativadores de vias independentes de TLR, como os receptores citosólicos NOD e RIG (Meylan et al., 2006). Há uma tendência futura na procura pela combinação do uso de adjuvantes que ativem múltiplas vias imunológicas, com menor risco de efeitos adversos e maior eficácia (Lahiri, 2008, Kamghang et al., 2008).

1.10 CÉLULAS CD4⁺ TH1 MULTIFUNCIONAIS .

Uma das grandes lacunas que ainda precisam ser preenchidas, para que os estudos com vacinas contra patógenos intracelulares possam ser conclusivos, é a determinação de fatores que possam caracterizar melhor uma resposta imune protetora e de memória imunológica. Sabe-se que uma resposta imune do tipo Th1 é necessária para o controle das infecções intracelulares, como é o caso das Leishmanioses e, até o momento, a maioria dos estudos envolvendo infecções, cuja resposta imune protetora envolve a indução de células do tipo 1, analisa a frequência de células produtoras de IFN- γ como o principal parâmetro correlacionado com proteção (Mendonça et al., 1995; De Luca et al., 1999; Gicheru et al., 2001; Campos-Neto, 2005). Embora a necessidade da presença desta citocina seja inquestionável, a sua utilização como parâmetro único nem sempre é suficiente para predizer proteção (Elias et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Vélez et al, 2005; Darrah et al., 2006). Atualmente, a citometria de fluxo multiparamétrica tem aumentado o número de variáveis que podem ser medidas simultaneamente, a nível de uma única célula, para incluir marcadores fenotípicos e/ou combinação de respostas funcionais como, por exemplo, a produção de citocinas (Seder et al., 2008). Neste caso, é possível avaliar não só a produção de IFN- γ , como também de outras citocinas por uma única célula como, por exemplo, o TNF- α e a IL-2.

Como já mencionado, o TNF- α é uma citocina efetora que, em sinergismo com o IFN- γ , contribui na destruição dos patógenos intracelulares. Já a IL-2, apesar de não ter uma ação efetora direta, contribui fortemente para a expansão e manutenção de células T CD4⁺ e CD8⁺,

levando ao desenvolvimento de uma resposta imune efetora mais eficiente (Fouds et al., 2006). Embora a IL-2 não seja uma citocina específica da resposta imune do tipo 1, ela deve ser medida para acessar a qualidade da resposta, pois além de influenciar a capacidade proliferativa, ela influencia a manutenção de células de memória (Seder et al., 2008). Desta forma, é possível que células CD4⁺ multifuncionais, que produzam IFN- γ , TNF- α e IL-2 simultaneamente, sejam aquelas relacionadas ao desenvolvimento de melhor função efetora e protetora nestas infecções (Darrah et al., 2007; Lindenstrøm et al., 2009).

A qualidade de uma resposta imune medida pela frequência de células multifuncionais desencadeadas pós-vacinação, demonstrou em modelo murino de infecção intradérmica ser um preditor de proteção contra infecção por *L. (L.) major* (Darrah et al., 2007). O estudo dessas células tem sido realizado em outras doenças infecciosas, como malária, tuberculose e HIV (Forbes et al., 2008; Betts et al., 2006; Huaman et al., 2009). Neste último caso, a presença de células multifuncionais CD8 foi relacionada a não progressão da doença (Betts et al., 2006). A habilidade dessas células de produzirem TNF- α e IL-2, além de IFN- γ , fornece capacidade efetora adicional, e aumenta a capacidade proliferativa, tornando essas células otimizadas para uma função efetora duradoura (Wu et al., 2002).

As células CD4⁺ Th1 têm recebido uma classificação baseada na sua produção de citocinas (Fouds et al., 2006). Embora essa classificação seja dada pela função que as células possuem, e não através de seus marcadores de superfície, mais comumente encontrado na literatura, existe com frequência uma concordância entre os dois tipos de classificação. Essas células podem seguir uma diferenciação linear adquirindo fenótipos de produção de citocinas que as classificam como células de memória (central ou efetora) ou células efetoras (Seder et al., 2008). Células virgens que são ativadas, e seguem o perfil do tipo Th1, passam por pelo menos quatro estágios principais de diferenciação: células de memória produtoras de IL-2 (também podem produzir TNF- α), células de memória efetoras multifuncionais (IFN- γ ⁺ IL-2⁺ TNF- α ⁺ e IFN- γ ⁺ IL-2⁻ TNF- α ⁺) e por último, células efetoras (IFN- γ ⁺) que ficam no final da linha de diferenciação, e entram em apoptose (**Figura 1.2**). Essa linha de diferenciação depende do tipo de estímulo e de sua intensidade, de forma que a célula não necessariamente passa por todos os estágios. Por exemplo, se um dado estímulo for muito intenso, ele pode induzir diretamente maiores percentagens de células efetoras produtoras de IFN- γ (Wu et al., 2002).

As células multifuncionais possuem função efetora mais potencializada, e a produção de IL-2 faz com que elas obtenham maior sobrevivência, capacidade de proliferação e geração de células de memória (Fouds et al., 2006). Além disso, quando a média de produção de citocina por célula é quantificada, as células multifuncionais produzem consideravelmente mais IFN- γ

do que as simples produtoras de IFN- γ (Wu et al., 2002; Grogan et al., 2001; Darrah et al., 2007). Dentro desta linha de raciocínio, um candidato vacinal que estimular uma maior produção de células multifuncionais, estaria relacionado com a proteção contra o desafio ou infecção natural.

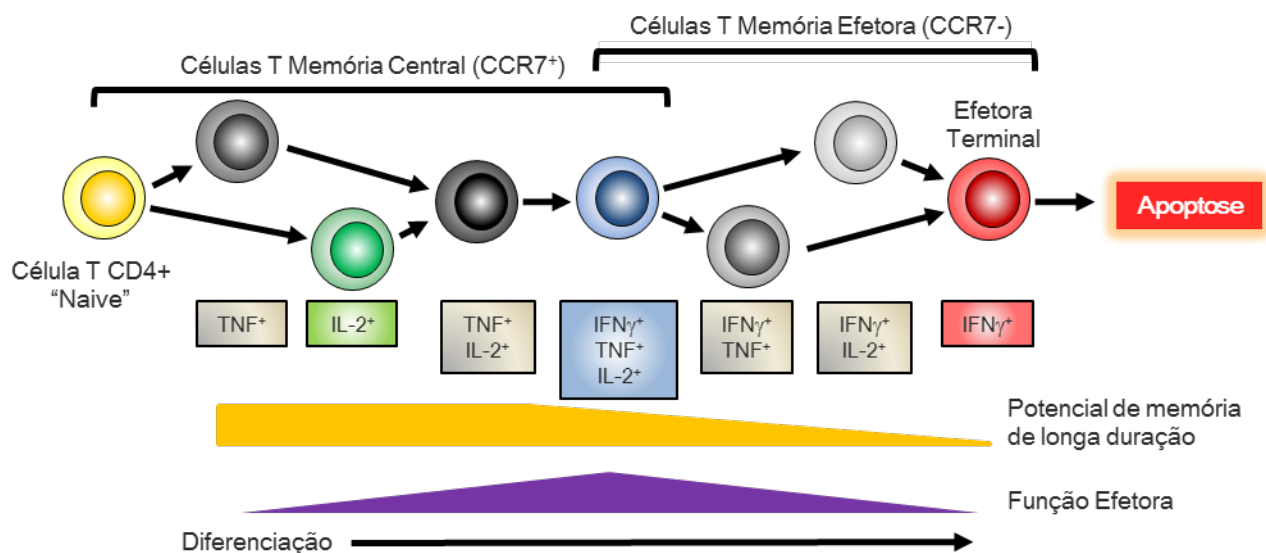


Figura 1.2: Desenvolvimento linear de células Th1 CD4+ baseada na produção de citocinas. (Adaptada de Seder et al., 2008).

2. OBJETIVOS

GERAL

Estudar a qualidade da resposta imune do tipo Th1 in vitro induzida por diferentes antígenos de *Leishmania* nas células de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA), provenientes do estado do Rio de Janeiro.

ESPECÍFICOS

- 1-** Caracterizar, através da citometria de fluxo, os fenótipos multifuncionais de linfócitos T produtores de IFN- γ , TNF- α e IL-2, induzidos pelo extrato total de promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* (LbT), em células obtidas de pacientes com LTA em atividade, curados e em indivíduos sadios provenientes do estado do Rio de Janeiro.
- 2-** Avaliar possíveis diferenças entre os fenótipos multifuncionais de linfócitos T induzidos por LbT e pelo extrato total de promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* (PH8T) em células obtidas de pacientes com LTA em atividade, curados que tiveram infecção com *L. (V.) braziliensis*.
- 3-** Comparar os fenótipos multifuncionais induzidos pelo extrato total PH8T e por frações subcelulares obtidas, por centrifugação diferencial, de promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis*.
- 4-** Correlacionar a capacidade de indução de fenótipos multifuncionais de linfócitos T induzidos pelos extratos totais LbT e PH8T com as fases da doença ou um possível envolvimento no processo de cura das lesões.
- 5-** Quantificar nos sobrenadantes de cultura de PBMC os níveis de IFN- γ induzidos pelos extratos totais e frações, e correlacioná-los com as frequências de células multifuncionais avaliadas na citometria de fluxo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística:

Foram estudados pacientes de LTA na forma cutânea durante a fase ativa da doença (antes do tratamento), e pacientes curados da forma cutânea com tempo de 110 dias após o término do tratamento (**Tabela 3.1**). Todos os pacientes receberam acompanhamento ambulatorial no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ e são residentes de áreas endêmicas e não endêmicas de leishmaniose do estado do Rio de Janeiro. Indivíduos

sadios, não provenientes de área endêmica e sem história prévia de infecção por *Leishmania*, foram utilizados como controle. Todos os pacientes e indivíduos sadios que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto de estudo recebeu aprovação pelo Comitê de Ética FIOCRUZ (CEP: 175/02), Comitê de Ética IPEC-Fiocruz (parecer 009/2006) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP - parecer no 790/2002). Foram coletadas informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes através do levantamento de prontuários.

Os pacientes foram diagnosticados para LTA por um ou mais teste diagnóstico (IDRM, sorologia, cultura e anatomia patológica de biópsia de lesão) e receberam tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde. O critério de cura foi definido pela epitelização das lesões ulceradas, regressão total da infiltração e eritema até três meses após a conclusão do esquema terapêutico, segundo as recomendações do Ministério da Saúde (MS, 2007). A composição dos grupos e os dados clínicos estão descritos na **tabela 3.1**.

Tabela 3.1: Grupos dos participantes incluídos no estudo composto por pacientes com Leishmaniose antes, após o tratamento e indivíduos sadios.

Grupo	Nº de indivíduos e sexo	Idade (média)	Número de lesões (média e desvio padrão)	Tempo de Evolução (média e desvio padrão)
LCL AT	18 (F=7;M=11)	41* ±16	1,1 ±0,47	2,5 meses ±2,4
LCL PT	18 (F=5;M=13)	40,28 ±15,7	1,72 ±1,01	3,22 meses ±1,6
Controles Sadios	14 (F=8;M=6)	28 ±7,14	-	-

LCL AT – Leishmaniose cutânea localizada antes do tratamento; LCL PT - Leishmaniose cutânea localizada 110 dias após o tratamento. * Teste t $p < 0,05$ em relação aos Controles Sadios. O tempo de evolução refere-se ao período que permaneceram com as lesões antes de iniciarem o tratamento. F= indivíduos do sexo feminino; M= indivíduos do sexo masculino.

3.2 Preparações dos extratos totais e das frações antigênicas:

Para obtenção das frações e extratos totais de *Leishmania* utilizados nos ensaios de antigenicidade, parasitos das cepas de referência de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e

L. (V.) braziliensis (MCAN/BR/98/R69) foram cultivados. As formas promastigotas foram expandidas separadamente em frascos de poliestireno de 25 cm² (Techno Plastic Products, Suíça) contendo meio de cultura Schneider (pH 7,2; “Schneider’s insect medium”, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) suplementado com 1,5mM de L-glutamina (Sigma, EUA), 10mM de HEPES (Sigma, EUA), antibióticos (200 UI de penicilina e 200µg/mL de estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (Thermo Scientific, EUA). Ao atingirem a fase estacionária de cultura (após 4 a 5 dias), as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfatado pH 7,2 (PBS) a 3000xg por 15 minutos, e o “pellet” ressuspensão em PBS. Em seguida, as suspensões de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* foram submetidas a 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (-196° C) e descongelamento a 37° C e posteriormente foi feita aplicação de ultra-som (40 Watts/15 min), obtendo-se desta forma, os extratos totais de *L. (L.) amazonensis* (PH8T) e *L. (V.) braziliensis* (LbT).

A partir de PH8T, foi seguido um protocolo de centrifugação diferencial para obtenção das preparações enriquecidas de frações subcelulares de membrana (PH8M), organela (PH8O), fração solúvel (PH8S) e particulada (PH8P) esquematizado na **Figura 3.1** (Telino et al.,2006). Após dosagem de proteínas totais em espectrofotômetro (Gene Quant, Amersham Bioscience, EUA) cada preparação teve a sua concentração ajustada para 1mg/ml em PBS e estocadas a -70°C até o momento de uso. As frações obtidas foram também processadas para análise em microscopia eletrônica de transmissão no Laboratório de Ultraestrutura Celular (IOC/FIOCRUZ).

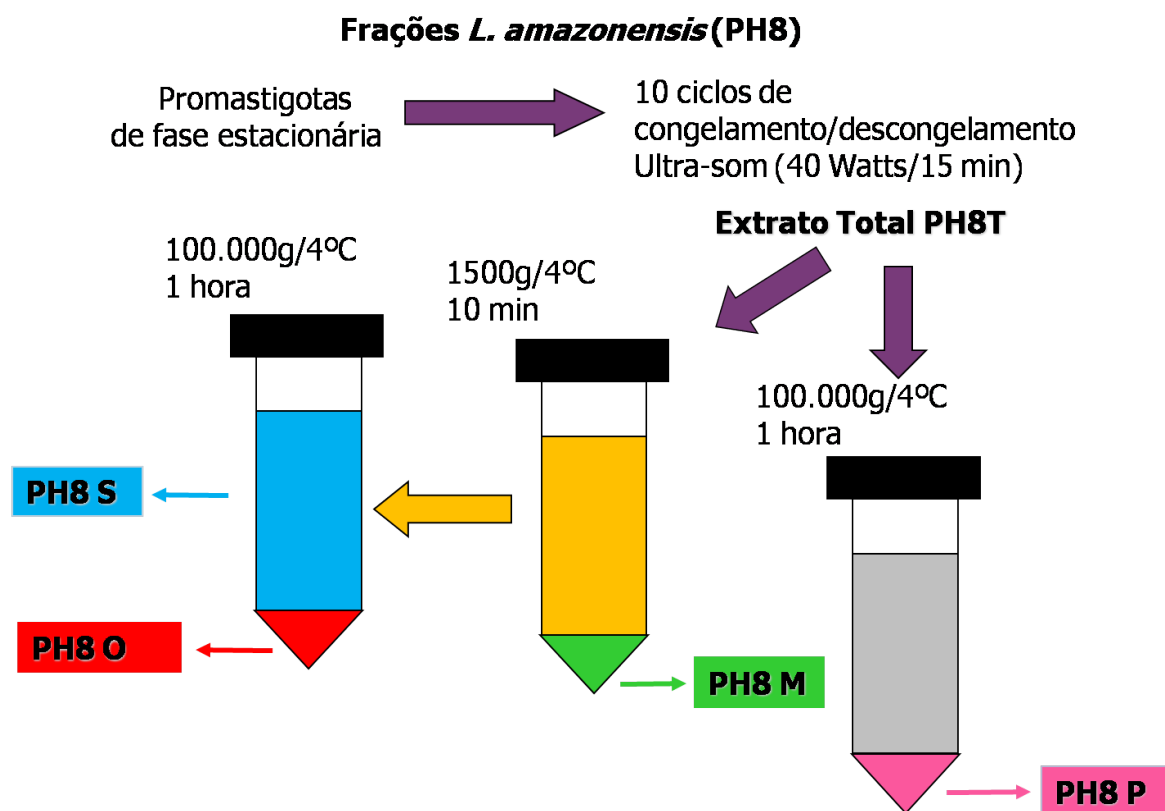


Figura 3.1. Esquema do protocolo para obtenção das preparações enriquecidas de frações subcelulares. A fração particulada em rosa (PH8P) é gerada a partir de ultracentrifugação do extrato total à velocidade de 100.000xg a 4° C durante uma hora. Outra parte do extrato total é centrifugada a 1500xg por 10 min, gerando a fração enriquecida de membranas no pellet do centrifugado e o sobrenadante é levado a uma centrifugação a 100.000xg por 1 hora a 4° C, gerando as frações solúveis (sobrenadante – em azul) e organelas (PH8O pellet - em vermelho).

3.3. Processamento das amostras para microscopia eletrônica de transmissão

As frações subcelulares enriquecidas de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* foram lavadas em PBS e fixadas por 1 h a 4°C com 2,5% de glutaraldeído (GA) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M contendo 3,5% de sacarose pH 7,2. Após fixação, as frações subcelulares foram lavadas no veículo do fixador por 3x 10 min cada. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas por 1 h a 4°C com tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M contendo 3,5% de sacarose pH 7,2 e desidratadas em série crescente de acetona (30%-100%). A infiltração em resina Poly Bed 812 (Epon) foi realizada “overnight” a 4°C na mistura Epon/Acetona (1:1) e, posteriormente, em Epon puro por 4 h a temperatura ambiente.

O material foi emblocado em Epon e mantido a 60°C por 72 h em estufa de polimerização. Em seguida, foram obtidos cortes ultrafinos em Ultramicrótomo Leica (UCT),

os quais foram recolhidos em grades de cobre (300 mesh). O material foi contrastado com acetato de uranila 2% por 10 min a temperatura ambiente e citrato de chumbo (0,8M $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 0,199M $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$ e 4 mL de NaOH 1N) por 2 min. As amostras foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL – JEM/1011

3.4. Coleta de material biológico:

Os pacientes avaliados pelo médico assistente e que aceitaram participar do estudo, foram submetidos à coleta de 20 mL de sangue periférico por venopunção em tubos contendo heparina (Becton Dickinson, Frankling Lakes, EUA). Do sangue heparinizado foram obtidas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) utilizadas para os ensaios in vitro (caracterização fenotípica e análise da produção de citocinas frente aos antígenos de *Leishmania*).

3.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico:

O sangue heparinizado foi diluído na proporção 1:1 com PBS e submetido a um gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque® 1077; Sigma, EUA). Em um tubo de 50mL (Corning Costar®, EUA) foi colocada uma proporção ficoll/sangue diluído de 1:2 e posteriormente o tubo foi centrifugado 1245g por 20 minutos à 20°C sem freio (HERAEUS®, UK). Após a centrifugação, houve a formação de um anel contendo as CMSP que foram coletadas com o auxílio de pipeta Pasteur. Em seguida, as CMSP foram lavadas duas vezes 500 g por 10 minutos a 4°C em PBS.

Após contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Hamburgo, Alemanha) utilizando-se o corante azul de Tripán (Sigma, EUA) e objetiva de 40 ao microscópio óptico (Nikon, China), as células foram ajustadas para a concentração de 3×10^6 por mL em meio RPMI suplementado com antibiótico, mercaptoetanol e L-glutamina acrescido de 10% de soro AB Rh⁺ inativado (Sigma, EUA).

3.6 Marcação intracelular de citocinas para citometria de fluxo multiparamétrica:

Foram plaqueadas 3×10^5 CMSP por poço em placas de 96 poços de fundo em U (Corning Costar®, EUA). Cada poço recebeu 10µg de um dos estímulos testados (**LbT**, **PH8T**, **PH8M**, **PH8S**, **PH8O**, **PH8P**) juntamente com anticorpo anti-CD28 (2µg/ml). Para controle positivo, foi utilizado o mitógeno ConA mais anticorpo anti-CD28 e para controle negativo, somente anticorpo anti-CD28. Oito poços com células que não receberam estímulo foram reservados para utilização como controles de marcação simples na compensação das

amostras no citômetro de fluxo. Após duas horas de incubação em estufa a 37°C com atmosfera úmida de 5% de CO₂ (NAPCO, NY, EUA), foi adicionado 10µg/ml de Brefeldina A (Sigma, EUA) a cada poço, permanecendo as células em cultura por um período de até 16 horas.

Após incubação com os estímulos na presença de Brefeldina A, a placa foi centrifugada a 500xg por 5 minutos e posteriormente as células foram lavadas com 200µl de PBS 500xg por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, foram adicionados a cada poço 100µl de tampão PBS contendo 0,1% de albumina sérica bovina e 0,05% de azida sódica (Sigma, EUA) juntamente com o *mix* de anticorpos monoclonais para marcação das moléculas de superfície específicas para sub populações de linfócitos T: CD8-PE-TexasRed (Invitrogen, EUA), CD4 APC-Cy7 e CD25-PE-Cy7 (ambos da eBioscience, EUA). Os poços para controle de marcação simples receberam o anticorpo monoclonal CD19 (eBioscience, EUA) marcados com os fluorocromos de interesse.

Após incubação por 30 minutos a 4°C no escuro, as células foram lavadas duas vezes com o tampão PBS/BSA 500xg por 5 minutos. Feita a lavagem para retirar o excesso de anticorpo, as células foram fixadas por 10 minutos em uma solução gelada de PBS contendo 4% de paraformaldeído (Sigma, EUA). Após lavagem com PBS/BSA 500 xg por 5min, foi adicionado a cada poço 100mL do tampão de permeabilização PBS/BSA contendo 0,1% de Saponina (PBS/BSA-SAP) (Sigma, EUA). Após duas horas de permeabilização a 4°C, as células receberam o *mix* de marcação intracelular contendo os anticorpos específicos para as citocinas de interesse: anti-IFN γ PE-Cy7, anti-TNF α FITC, anti-IL2 APC e anti-IL10 PE (eBioscience, EUA) e foram incubadas por 30 minutos adicionais a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas uma vez com PBS/BSA-SAP e subsequentemente com PBS/BSA para retirar os anticorpos não ligados e fechar os poros da membrana das células, respectivamente. As células foram posteriormente transferidas para mini-tubos de 1mL (Nuclon) e estocadas a 4°C até o momento da análise por citometria de fluxo.

Em um período máximo de 24h após a marcação intracelular, as células foram levadas para aquisição no citômetro de fluxo Cyan (Beckman Coulter, CO, EUA) que pertence à plataforma de citometria de fluxo, núcleo de análise do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, coordenado pela Dra Andrea Henriques Pons e operado pelo técnico Alessandro Marins. Um total de 30.000 eventos foi adquirido dentro da região de linfócitos em cada tubo de amostra avaliado.

3.7 Análises dos fenótipos de linfócitos e da produção de citocinas:

Para análise dos dados de citometria de fluxo, foi utilizado o *software* FlowJo (Flow Cytometry Analyses Software, Tree Star, EUA). A população de linfócitos foi definida a partir da criação de uma região em gráfico de *dot plot* baseado no tamanho no eixo “x” (FSC: *foward scatter*) versus granulosidade das células (SSC: *side-scatter*) no eixo “y” (**Figura 3.2 A**). Dentro dessa região, definimos as subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) (**Figura 3.2 B**) e dentro de cada subpopulação de linfócito foi criada uma nova região para avaliação das marcações com citocinas.

A frequência e a intensidade de fluorescência de cada citocina foram avaliadas individualmente dentro da região de linfócitos CD4 ou CD8 (**Figura 3.2 C**). Posteriormente, aplicou-se a ferramenta de análise combinatória de *gates* para obtenção dos resultados das células produtoras de uma, duas ou três citocinas simultaneamente, visando identificar as células multifuncionais.

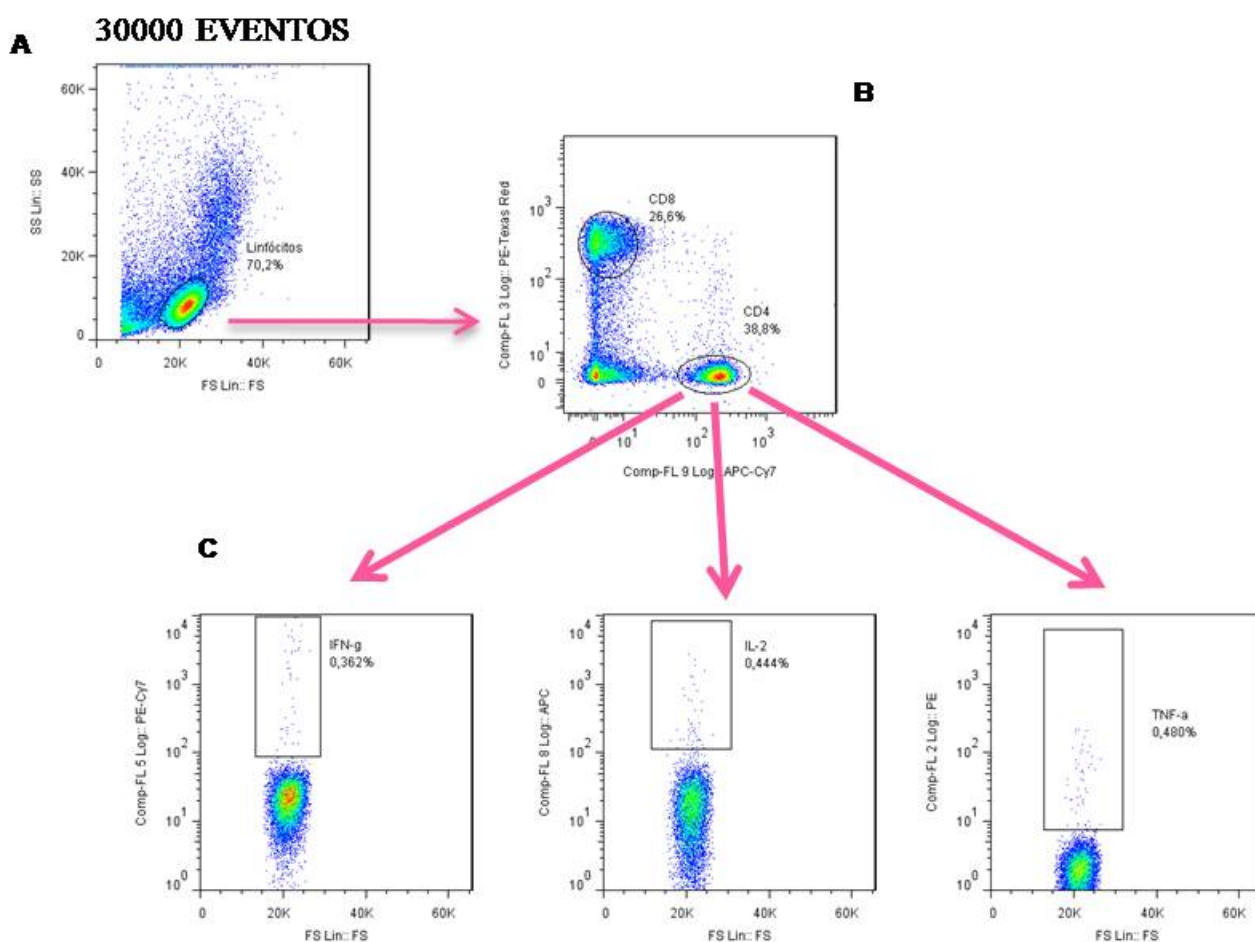


Figura 3.2 Análise da frequência de populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ e de células produtoras de citocinas.

Para análise de produção total de cada citocina de forma individual, foi utilizada uma medida adotada por Darrah e colaboradores (2007) chamada de iMFI, traduzida do inglês, intensidade de fluorescência integrada. Ela é obtida através da multiplicação da frequência de uma população de célula produtora de uma citocina particular, pela intensidade média de fluorescência:

$$\mathbf{iMFI = \text{frequência de células} \times \text{MFI.}}$$

Com o resultado da iMFI obtida, subtraímos pelo resultado do iMFI da amostra que não recebeu estímulo do mesmo paciente.

3.8 ELISA de IFN- γ

Um total de 1×10^6 CMSP obtidas de pacientes e controles sadios foram independentemente estimuladas em placas de 24 poços (Nunc, EUA) com os extratos totais (PH8T e LbT) e frações antigênicas de *L. (L) amazonensis* ($10 \mu\text{g/ml}$) e cultivadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 (NAPCO, NY, EUA). Os sobrenadantes de culturas foram coletados após 120 horas para dosagem da citocina IFN- γ com o kit BD OptEIA™ (BDBiosciences-EUA). O limite máximo de detecção do kit era de 300pg/mL e o mínimo de $4,7 \text{pg/mL}$.

3.9 Análises estatísticas:

Os resultados foram analisados usando o programa de Prism 5.0 aplicando os testes não paramétricos de Wilcoxon (para análise dos resultados obtidos em cada estímulo, dentro do mesmo grupo de paciente ou controle) e Mann Whitney (na análise entre grupos diferentes). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o intervalo de confiança apresentou valores de p menores que 0,05.

Os gráficos e as análises foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prisma 4 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Análise ultraestrutural das frações enriquecidas de membrana, organela, e de componentes particulados de promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis*:

A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão das frações enriquecidas de conteúdos subcelulares obtidas através da ultracentrifugação, confirma o sucesso do fracionamento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. A fração enriquecida de membrana revelou uma concentração abundante de estruturas membranares, a fração particulada também revelou alta concentração de estruturas de membrana associadas com material elétron-denso. Também, a fração de organela revelou-se rica em estruturas semelhantes às organelas, sendo possível a visualização de microtúbulos. (**Figura 4.1A, B e C**, respectivamente).

4.2 Percentuais de células CD4⁺ e CD8⁺:

Em relação à frequência de linfócitos CD4⁺, observamos percentuais semelhantes deste tipo celular após estimulação com todos os antígenos testados, nos grupos de pacientes antes e pós-tratamento, e no grupo controle (**Figura 4.2A, B, C, D, E e F**). O mesmo ocorre ao compararmos os extratos totais LbT com PH8T, e PH8T com as frações PH8M, PH8P, PH8O e PH8S (**Figura 4.2**).

Observa-se em todos os estímulos que as células CD8⁺ tendem a ser menos frequentes nos pacientes AT, em comparação aos pacientes pós-tratamento e ao grupo controle, porém não observamos diferenças significativas. Os percentuais de CD8⁺ não apresentaram nenhuma diferença quando os extratos totais e as frações foram comparadas entre si, dentro do mesmo grupo (AT, PT e Ctrl) (**Figura 4.2**).

4.3 Frequência de células CD4⁺ CD25⁺:

O percentual de células CD4⁺CD25⁺ foi bem variado em todos os grupos e com os diferentes estímulos, não sendo possível observar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de pacientes e controles após estimulação com cada antígeno, nem ao compararmos os estímulos entre si dentro do mesmo grupo (**Figura 4.3**). Avaliamos a frequência das células T CD4⁺CD25⁺IL-10⁺, as células Tr1, mas as células CD4⁺CD25⁺ não tiveram marcação positiva para IL-10 (dados não mostrados).

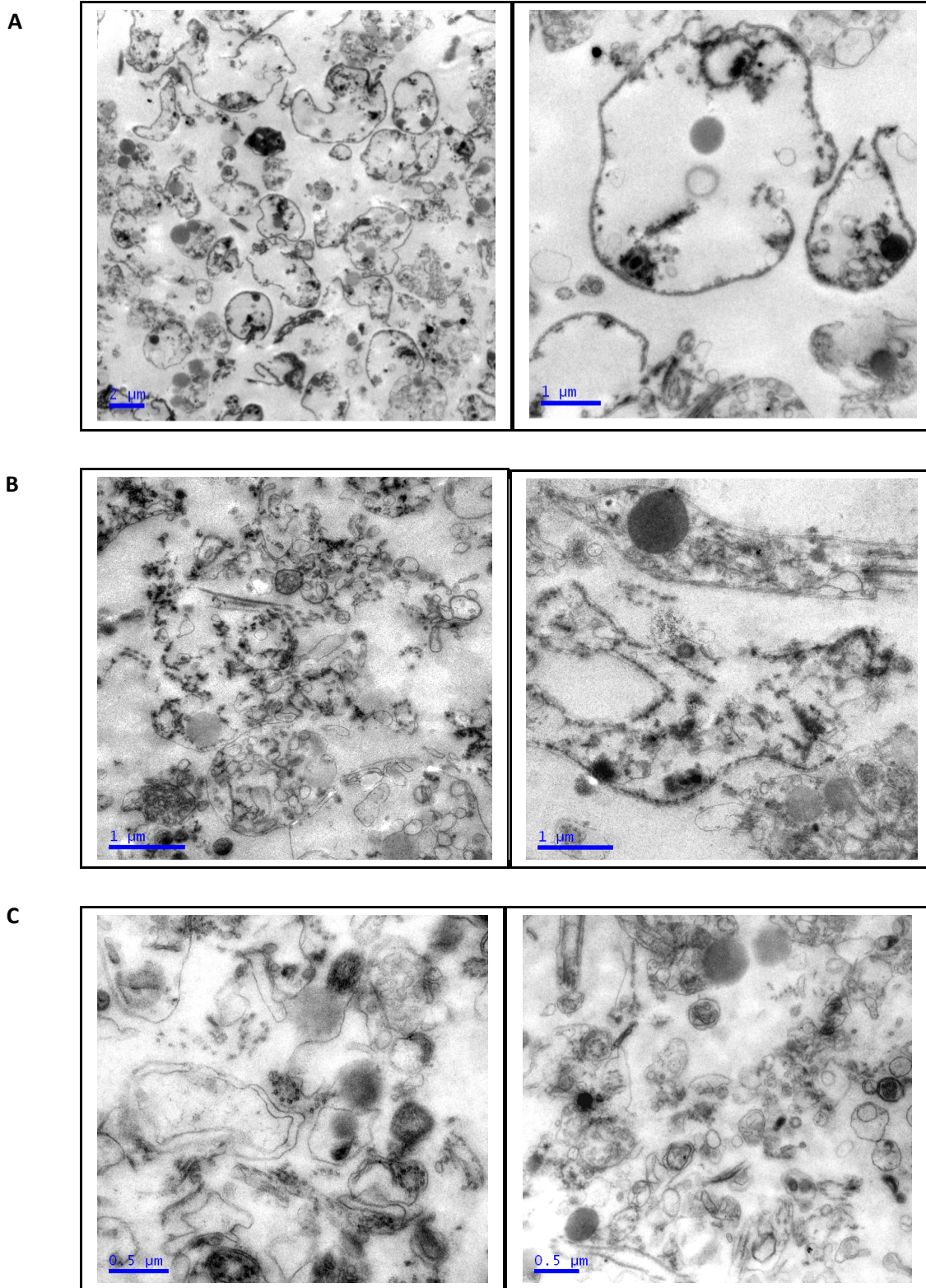


Figura 4.1. Análise ultra-estrutural das preparações antigênicas de promastigotas de *L.(L.) amazonensis* por microscopia eletrônica de transmissão: (A) Fração enriquecida de membranas; (B) Fração Particulada e (C) Fração rica em organelas.

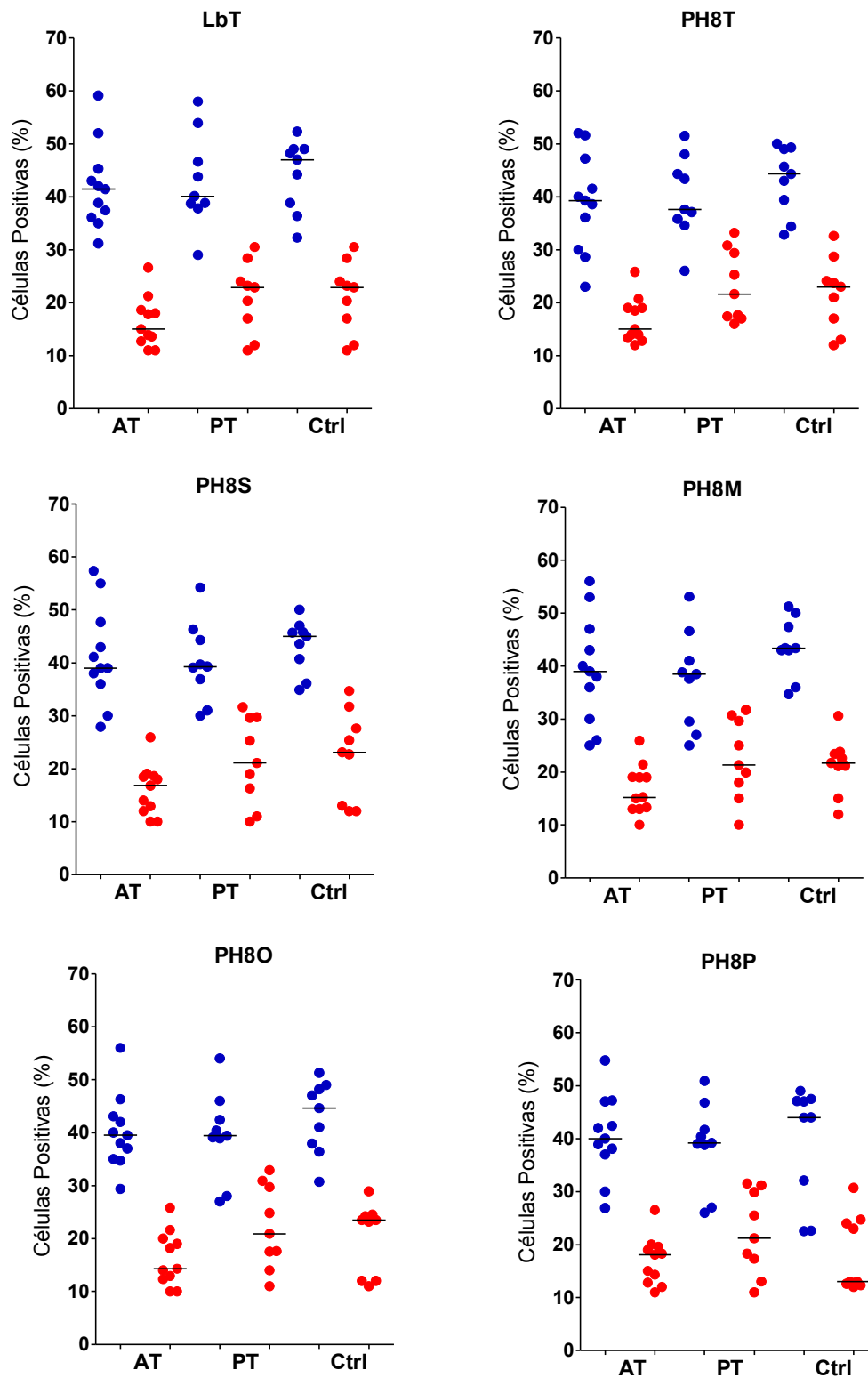


Figura 4.2: Percentuais de linfócitos T CD4+ (azul) e CD8+ (vermelho) induzidos pelos antígenos totais LbT e PH8T e pelas diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl). As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo de resultados.

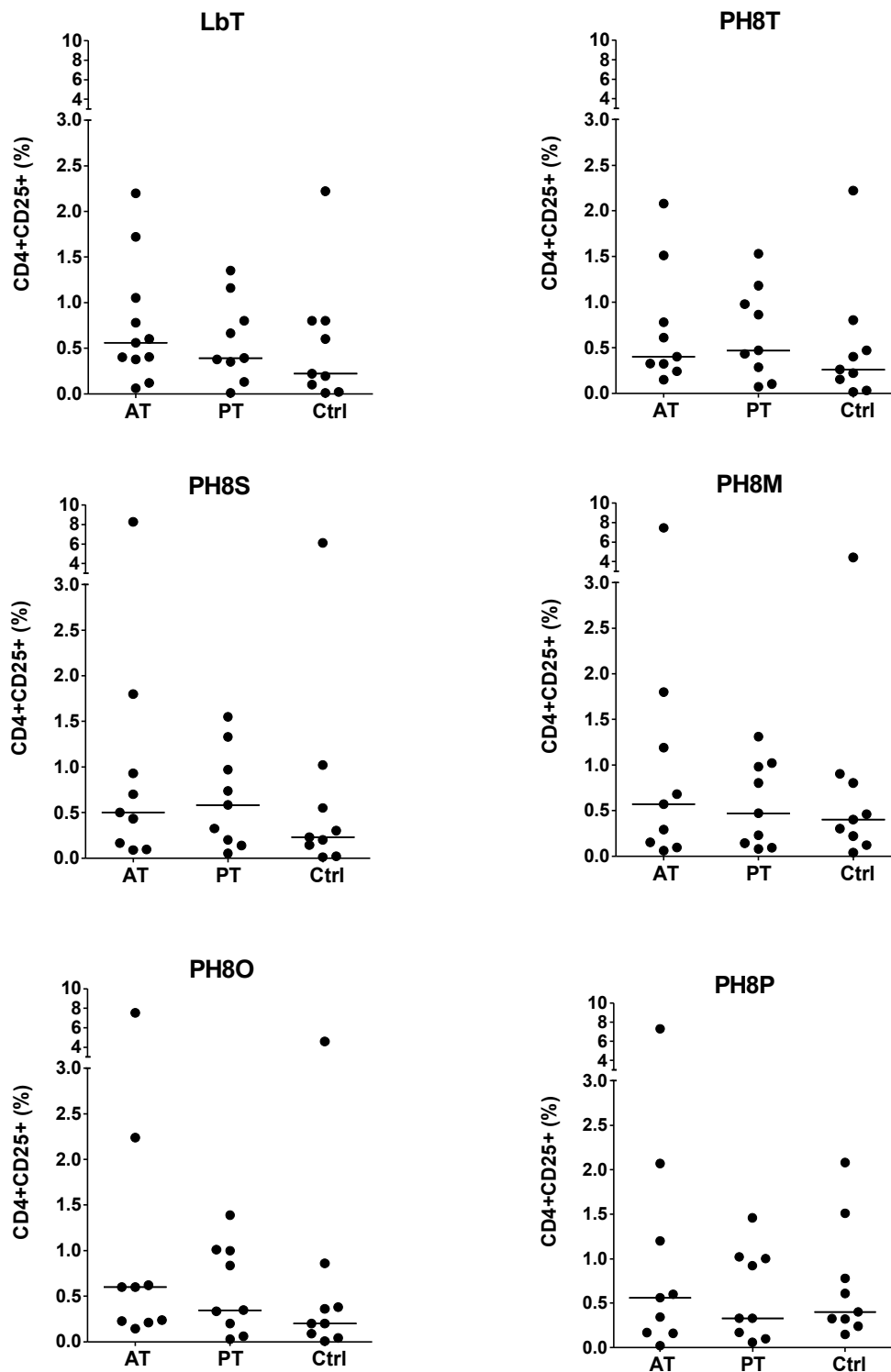


Figura 4.3: Percentuais de linfócitos T CD4+CD25+ induzidos pelos antígenos totais LbT e PH8T e pelas diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl). As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo de resultados.

4.4 iMFI de células CD4⁺ produtoras de citocinas:

Como relatado na metodologia, empregamos em nossa avaliação a média de intensidade de fluorescência integrada, ou iMFI, que é o resultado da multiplicação da frequência de células produtoras de determinada citocina, pela sua intensidade média de fluorescência.

Os pacientes pós-tratamento tiveram aumento da iMFI de CD4⁺ produtoras de IFN- γ em relação aos controles sadios frente a todos os estímulos: extrato total de Lb (LbT) PT>Lb Ctrl (p=0,0012); PH8T PT> Ctrl (p=0,002); PH8S PT> Ctrl (p=0,005); PH8M PT> Ctrl (p=0,007); PH8O PT> Ctrl (p=0,008) e PH8P PT> Ctrl (p=0,0012) (**Figura 4.4**). No grupo dos pacientes antes do tratamento, somente o estímulo PH8T AT apresentou uma iMFI significativamente maior quando comparada aquela obtida no grupo controle. Não foram observadas diferenças significantes entre os antígenos totais LbT e PH8T. As frações de PH8 também não apresentaram diferenças significativas quando comparadas entre si, dentro do mesmo grupo (AT, PT e Ctrl) (**Figura 4.4**).

A iMFI de TNF- α foi mais elevada no grupo dos pacientes pós-tratamento em relação ao grupo controle com todos os estímulos, com exceção de PH8P: LbT PT> Ctrl (p=0,0002); PH8T PT> Ctrl (p=0,01); PH8S PT> Ctrl (p=0,01); PH8M PT> Ctrl (p=0,01); PH8O PT> Ctrl (p=0,01). No grupo de pacientes estudados antes do tratamento, os extratos totais de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) amazonensis*, bem como a fração PH8S, induziram maior iMFI em relação ao grupo controle. Não encontramos diferenças significativas ao compararmos as iMFIs induzidas pelas frações de PH8 dentro do mesmo grupo (AT, PT e Ctrl) (**Figura 4.5**).

O extrato LbT induziu maior iMFI de IL-2 no grupo PT, quando comparado ao grupo controle (p=0,0019). Comparando os extratos totais, a iMFI de IL-2 foi maior no estímulo com LbT do que com o extrato total de La (PH8T) nos pacientes pós-tratamento (p=0,039). As frações não induziram diferenças significativas quando comparadas entre si, dentro do mesmo grupo (AT, PT e Ctrl), porém, na comparação entre os grupos, a fração solúvel (PH8S) induziu maior iMFI de IL-2 nos pacientes AT em relação ao grupo PT e ao grupo controle (p=0,04 e p=0,0078), e PH8P PT foi maior que PH8P Ctrl (p=0,002) (**Figura 4.6**).

Em relação à IL-10, tanto a frequência de células produtoras desta citocina como a iMFI foram muito variáveis, não tendo sido observado diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das comparações realizadas.

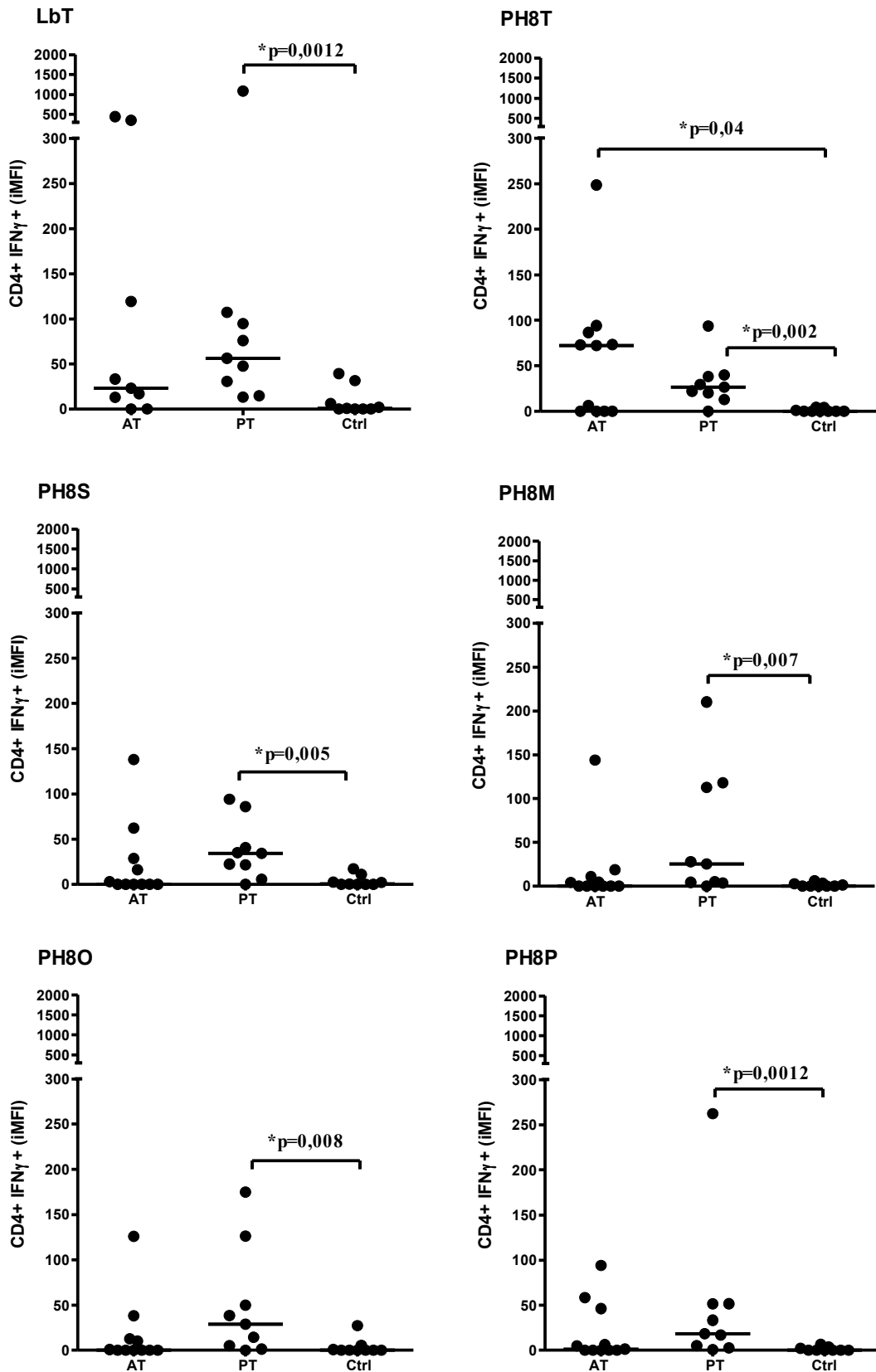


Figura 4.4: iMFI das células T CD4+ produtoras de IFN γ , induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T e pelas diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl). * Mann-Whitney p<0,05. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo.

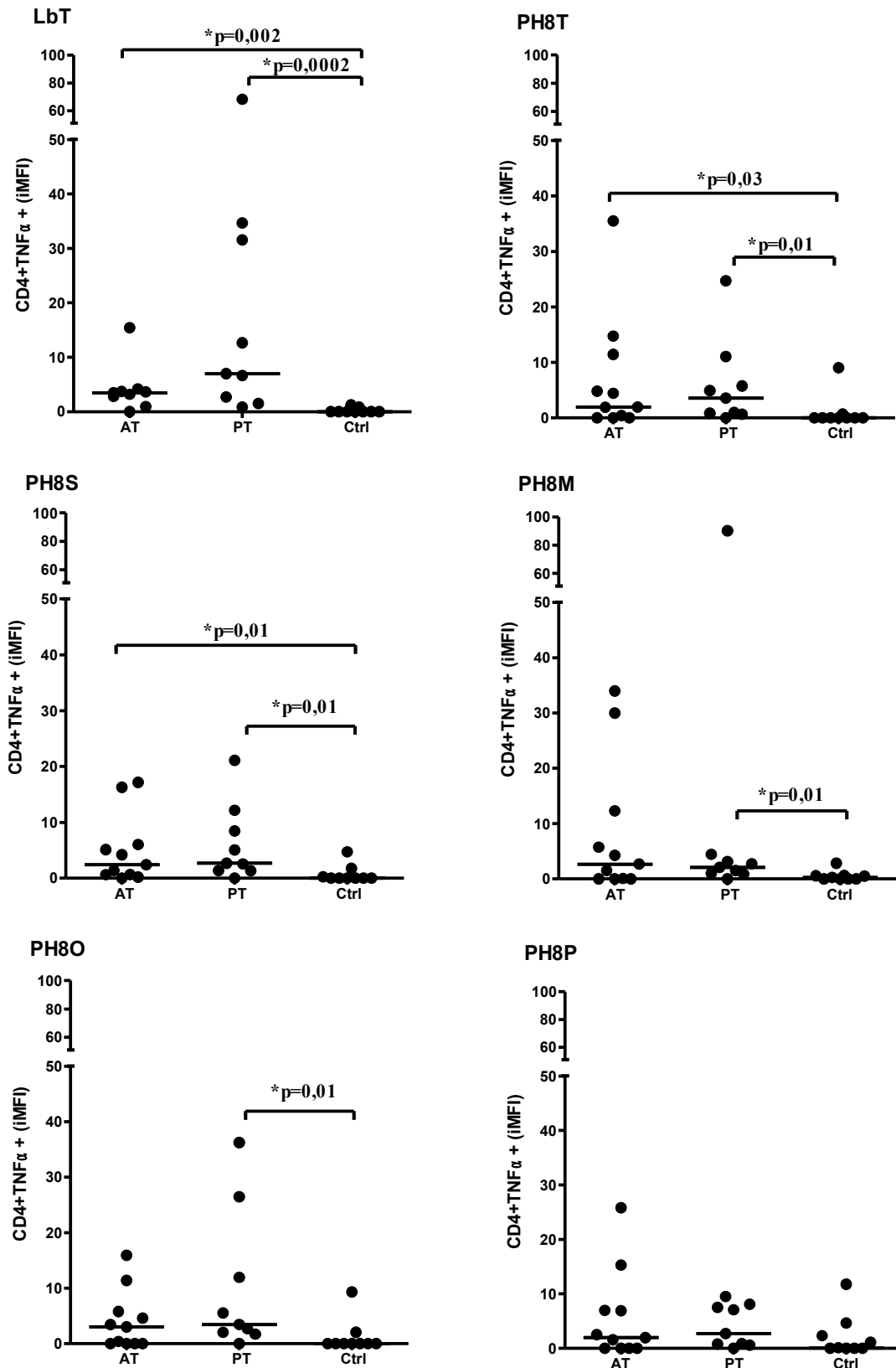


Figura 4.5: iMFI das células T CD4+ produtoras de TNF α , induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T e pelas diferentes frações de *L. (L.)amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl). * Mann-Whitney $p < 0,05$. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo.

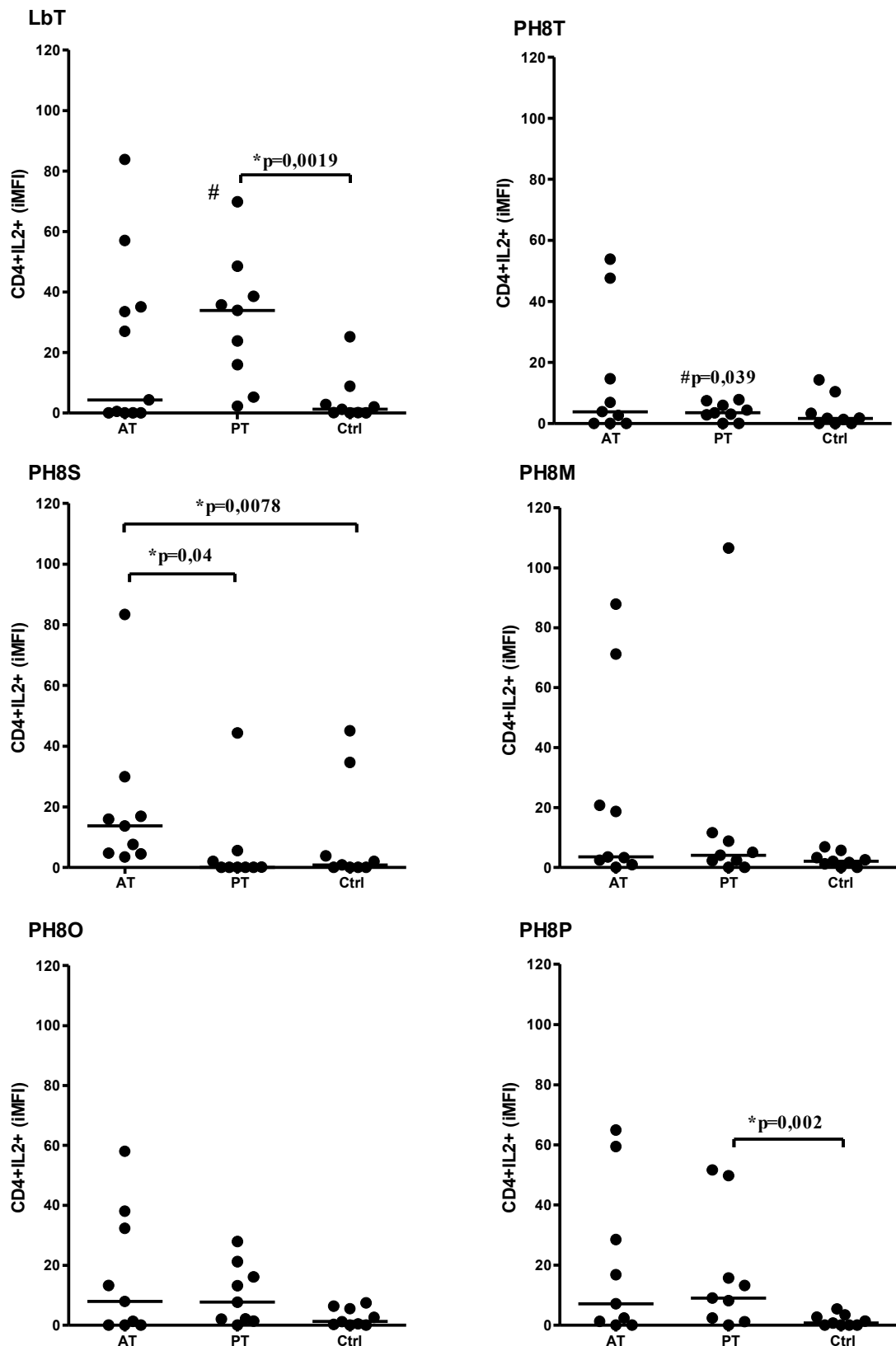


Figura 4.6: iMFI das células T CD4+ produtoras de IL-2, induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T e pelas diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl). * Mann-Whitney $p < 0,05$. # Wilcoxon $p < 0,05$. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo.

4.5 iMFI de células CD8+ produtoras de citocinas:

O extrato LbT foi o único estímulo que induziu maior iMFI para IFN- γ e TNF- α nos pacientes PT, comparado ao grupo controle (**Figuras 4.7 e 4.8**).

A iMFI de IL-2 foi maior no grupo AT, em relação ao grupo PT, nas células estimuladas com os extratos totais de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e com as frações PH8O, PH8S e PH8P. O extrato total PH8T e as frações PH8M, PH8S e PH8P induziram iMFI maiores no grupo AT, quando comparadas ao grupo controle (**Figura 4.9**).

Com relação a IL-10, fomos capazes de detectar células CD8+ produtoras desta citocina, porém, da mesma forma que observado com as células CD4+, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada.

4.6 Avaliação de fenótipo de células multifuncionais e células produtoras de uma ou duas citocinas:

4.6.1 Células CD4+:

Como já foi relatado, quando analisamos as iMFIs para IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺ e IL-2⁺, induzidas por cada antígeno nos 3 grupos estudados, fomos capazes de encontrar diferenças consistentes apenas na comparação do grupo de pacientes pós-tratamento, com o grupo controle, com nenhuma diferença a nível de uma única célula (**Figura 1.2**). O resultado da frequência destas populações distintas define a qualidade da resposta imune do tipo Th1. Desta forma, a frequência total de células produtoras de IFN- γ seria composta por 4 populações distintas: simples produtoras de IFN- γ , duplas produtoras IFN- γ ⁺TNF- α ⁺ ou IFN- γ ⁺IL-2⁺ e células multifuncionais (IFN- γ ⁺TNF- α ⁺IL-2⁺).

Avaliando as frequências de cada um destes fenótipos, observamos que o extrato total LbT (**Figura 4.10**) induziu maior frequência de células multifuncionais (IFN- γ ⁺TNF- α ⁺IL-2⁺) no grupo de pacientes PT, do que nos grupos AT e controle (p=0,02 e p=0,001, respectivamente). No grupo dos pacientes PT, as células IFN- γ ⁺IL-2⁺ tiveram frequência maior que o grupo controle (p=0,02). Observa-se que as células produtoras de IFN- γ ⁺TNF- α ⁺ foram mais frequentes nos grupos AT e PT, quando comparados ao controle, assim como as células simples produtoras

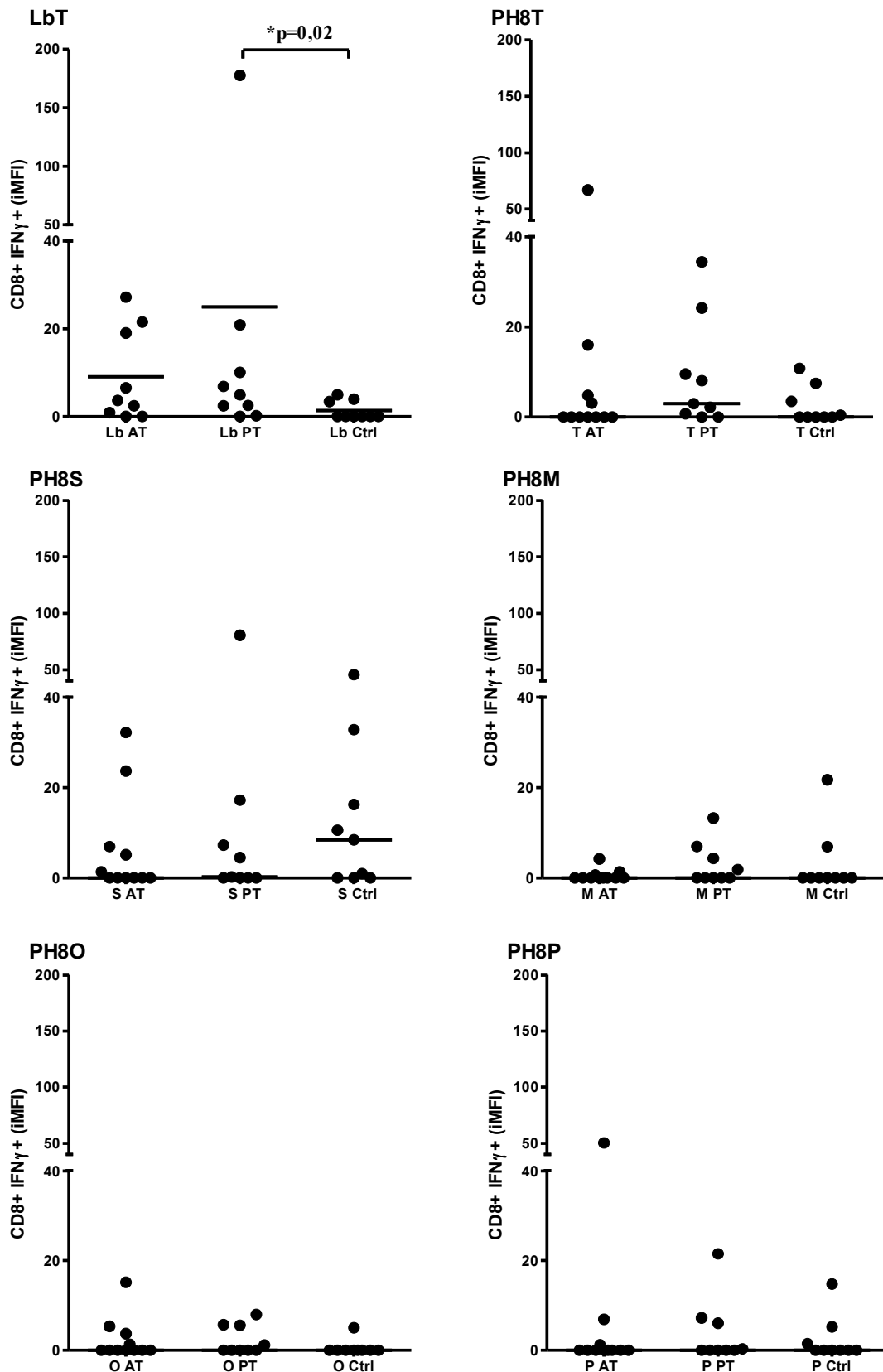


Figura 4.7: iMFI das células T CD8+ produtoras de IFN γ , induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T e pelas diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl). * Mann-Whitney $p<0,05$. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo.

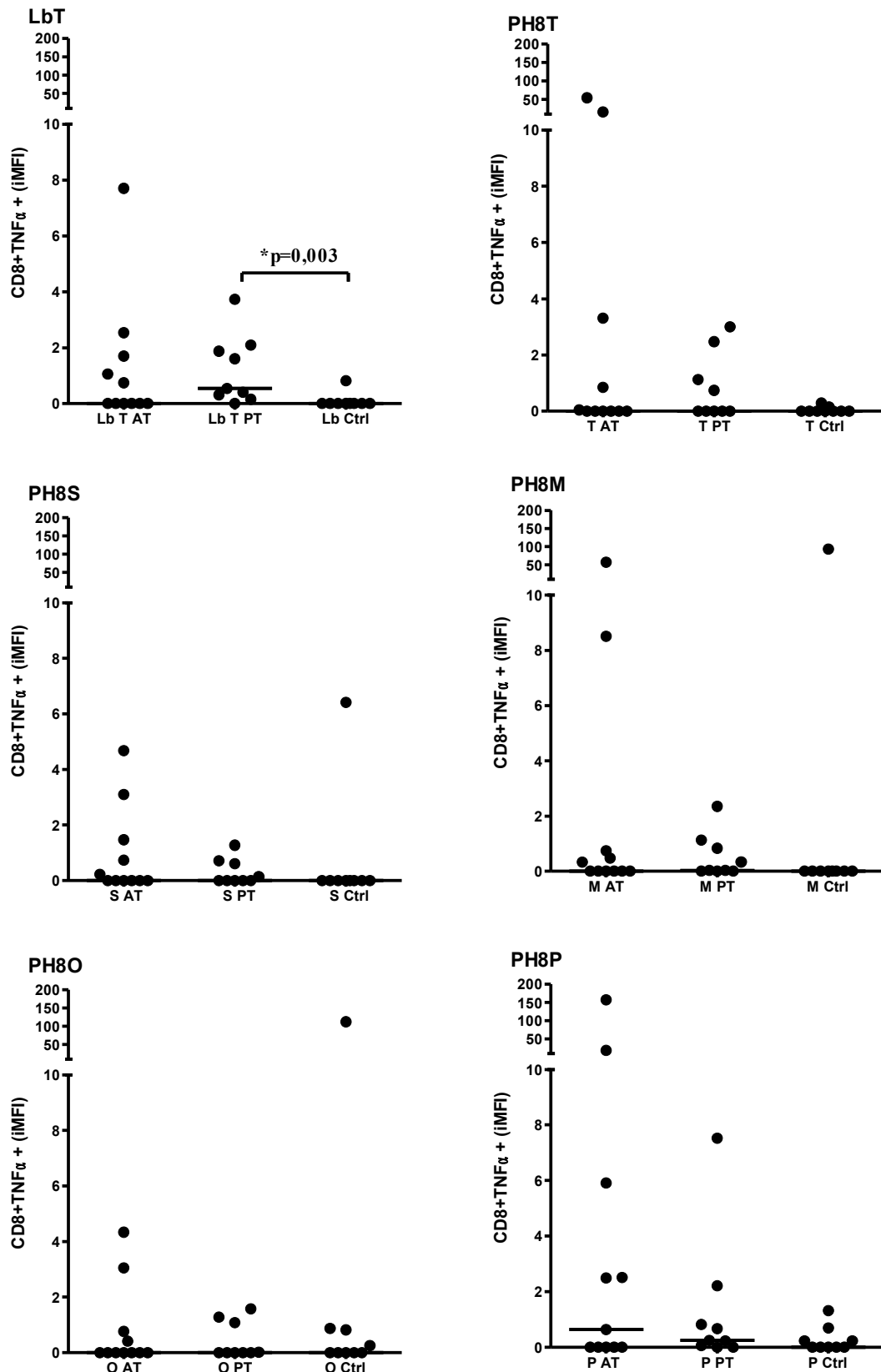


Figura 4.8: iMFI das células T CD8+ produtoras de TNF α , induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T e pelas diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl). * Mann-Whitney $p < 0,05$. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo.

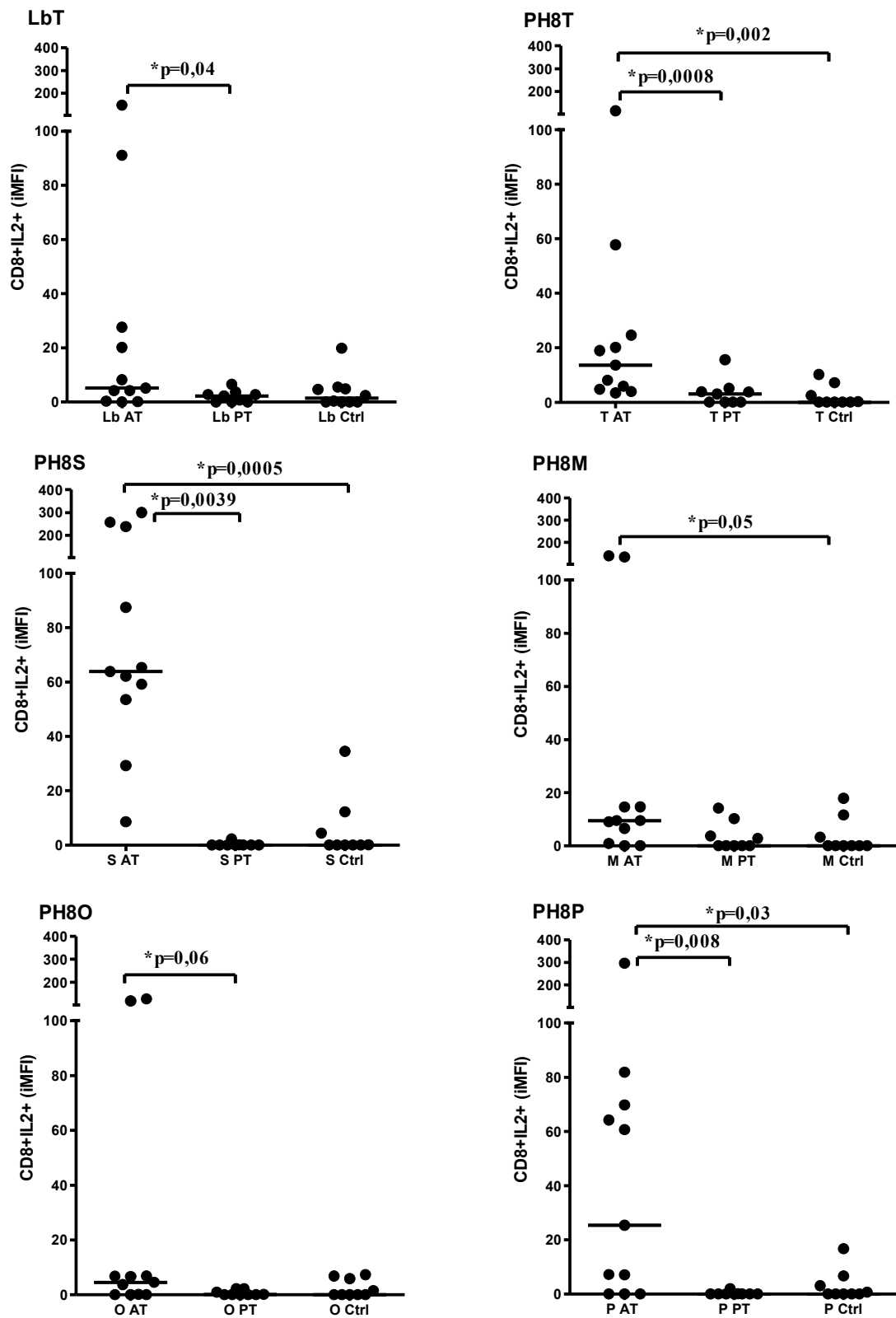


Figura 4.9: iMFI das células T CD8+ produtoras de IL-2, induzidas pelos antígenos totais LbT e PH8T e pelas diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl). * Mann-Whitney $p < 0,05$. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo.

de IFN- γ^+ ; sendo que o grupo PT apresentou o maior percentual deste último fenótipo (**Figura 4.10**). As frequências de células CD4⁺ simples produtoras de IL-2 ou de TNF- \square foram maiores no grupo AT, em relação aos outros grupos. As células que produziram duas citocinas (TNF- α^+ IL-2⁺ e IFN- γ^+ IL-2⁺) tiveram tendência ao aumento nos grupos de pacientes AT, em relação ao grupo controle, mas sem diferenças estatisticamente significantes.

O estímulo PH8T (**Figura 4.10**) induziu significativamente maiores frequências de células triplo positivas nos grupos AT e PT, em relação ao controle (p=0,004 e p=0,003, respectivamente). As células efetoras IFN- γ^+ TNF- α^+ foram mais frequentes no grupo AT, em relação ao controle (p=0,02). Destacamos as altas frequências de células simples produtoras de IFN- γ^+ induzidas pelo extrato total PH8T, observadas nos grupos de pacientes (tanto antes, como pós-tratamento). Já as células produtoras de duas citocinas (TNF- α^+ IL-2⁺ e IFN- γ^+ IL-2⁺) foram menos frequentes que os demais fenótipos.

Comparando os estímulos com os extratos totais de Lb (LbT) e La (PH8T) entre si, encontramos diferenças significantes nas frequências de células multifuncionais e células IFN- γ^+ IL-2⁺ no grupo de pacientes pós tratamento, com maior indução destes fenótipos no estímulo com LbT (p=0,007 e p=0,03, respectivamente).

Observando-se os resultados obtidos após o estímulo das células de pacientes (AT e PT) com as frações de La (PH8M, PH8O e PH8P), verificamos uma tendência a maior indução de células produtoras de uma única citocina, em comparação aos outros fenótipos avaliados, com exceção da fração solúvel (**Figura 4.11**).

Na estimulação com a fração PH8S, as células simples positivas para IL-2 tiveram destaque sobre os outros fenótipos celulares, e foram mais frequentes em relação às células dupla positivas para TNF- \square^+ e IL-2⁺ nos grupos AT e PT (p=0,008, ambas). No grupo AT, o fenótipo IL-2 simples- positivo foi superior à célula multifuncional (p=0,04). Porém, quando as células simples positivas foram avaliadas dentro dos grupos estudados, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada. Por outro lado, as células multifuncionais foram mais frequentes no grupo PT, em relação aos grupos controle e pacientes AT (p=0,003 e p=0,01, respectivamente). Os percentuais de células IFN- γ^+ TNF- α^+ foram maiores nos grupos de pacientes AT e PT, do que no grupo controle (p=0,01 e p=0,005, respectivamente).

O extrato enriquecido de membrana (PH8M) induziu altas frequências de células produtoras de TNF- α nos grupos AT e PT, quando comparadas aos outros fenótipos celulares dos mesmos grupos, sendo significativamente maiores do que o fenótipo TNF⁺IL2⁺ (**Figura 4.11**). As células produtoras de TNF- α foram mais frequentes nos grupos AT e PT, quando comparados ao grupo controle (p=0,0074 e p=0,0076 respectivamente). Nos grupos de pacientes AT e PT estudados com este antígeno, também observamos maiores frequências de

células multifuncionais, quando comparados ao grupo controle ($p=0,06$ e $p=0,0036$, respectivamente). No grupo de pacientes PT, PH8M induziu percentuais significativamente maiores de células dupla positivas para IFN- γ e TNF- α em relação ao controle ($p=0,01$). As frequências de células simples produtoras de IL-2 ou de IFN- γ tendem a ser mais altas no grupo AT, em relação aos outros dois grupos, mas não houve diferença significativa.

Uma frequência elevada de células simples produtoras de TNF- α também foi observada nos grupos de pacientes após estímulo com a fração PH8O no grupo PT, com diferença significativa sendo observada em relação ao grupo controle ($p=0,03$). No estímulo com o antígeno PH8O, o grupo PT foi o maior indutor de células CD4⁺ com fenótipo multifuncional, com diferença significativa em relação aos grupos de pacientes AT e controle ($p=0,04$ e $p=0,003$, respectivamente). O grupo AT também induziu maior frequência de células multifuncionais em relação ao grupo controle ($p=0,01$). O fenótipo IFN- γ ⁺TNF- α ⁺ foi mais frequente no grupo de pacientes PT, quando comparado ao grupo controle ($p=0,02$).

Após estimulação com o antígeno particulado de La (PH8P), observamos uma maior tendência da indução do fenótipo TNF- α em relação aos outros fenótipos de células (**Figura 4.11**). No grupo AT, este fenótipo foi significativamente superior a todos os outros (com $p<0,05$), exceto nas células produtoras somente de IFN- γ . Por outro lado, no grupo dos pacientes PT, não existiu diferença significativa, apesar da maior frequência em relação aos outros fenótipos celulares. Comparando os três grupos estudados entre si, não encontramos diferenças significativas na produção de TNF- α após estimulação com esta fração, mas sim nas células multifuncionais no grupo PT, em relação aos grupos AT e controle ($p=0,025$ e $p=0,033$, respectivamente), bem como duplas produtoras de IFN- γ e TNF- α no grupo de pacientes pós-tratamento, quando comparado ao grupo controle ($p=0,03$).

As diferenças na qualidade da resposta imune do tipo Th1 podem ser mais bem evidenciadas quando avaliamos a contribuição de cada fenótipo de células produtoras de citocinas, em gráficos de gráfico de setores (**Figura 4.12**). Ao observar o total da contribuição dos tipos celulares produtores de IFN- γ (linha roxa), verificamos que estas células parecem aumentar sua proporção apenas na estimulação com o extrato total LbT e com a fração PH8M. No grupo controle, a contribuição destas células é menor do que 50% para todos os antígenos de *L. (L.) amazonensis* (total e frações), e de 55% para o extrato total LbT. Apesar destas diferenças não serem tão definidas, existem alterações marcantes quando passamos a analisar separadamente a contribuição de cada fenótipo produtor desta citocina, principalmente no que se refere às células multifuncionais produtoras de IFN- γ TNF- α e IL-2 (em azul), e as células efetoras terminais simples produtoras de IFN- γ (em vermelho). Observa-se que as células multifuncionais no grupo AT estão em maior proporção

no extrato total LbT (10%), em relação à proporção dessas células induzidas por outros estímulos. Este padrão é seguido de PH8T, contribuindo com 8% da população total, PH8O (7%), PH8M (5%), PH8 S (4%) e PH8P (3%). Em geral, notamos um aumento na contribuição desse fenótipo celular no grupo de pacientes pós-tratamento, com o extrato total LbT apresentando a maior proporção de células IFN- γ ⁺TNF- α ⁺IL-2⁺, contribuindo com 28% da resposta imune do tipo Th1 total (que consiste no somatório de células CD4⁺ dos 7 fenótipos Th1 avaliados), seguido de PH8M (23%), PH8O (12%), PH8T e PH8S (10%, ambas), e PH8P (9%). O extrato total PH8T foi o que apresentou a menor alteração neste fenótipo, quando comparamos os grupos antes e pós-tratamento (apenas 2% de aumento). No grupo controle, a proporção desta população foi muito rara, inexistente para alguns estímulos.

As células efetoras terminais, produtoras exclusivamente de IFN- γ (em vermelho), foram as que mais contribuíram para a resposta imune Th1 na estimulação com o extrato total PH8T (43% antes do tratamento, e 38% pós-tratamento), seguido de PH8S (30%) nos pacientes AT. Com a estimulação com o antígeno total LbT, este tipo celular contribuiu com 20% da resposta antes do tratamento, e 21% pós-tratamento. Nota-se uma tendência à manutenção ou diminuição da contribuição deste fenótipo após o tratamento. Entre os controles, sua contribuição fica em torno de 20%, com exceção de PH8T (12%).

A contribuição de células que são classificadas como aquelas que estariam no início da diferenciação da resposta imune do tipo Th1 (IL-2⁺, TNF- α ⁺, IL-2⁺TNF- α ⁺ em verde, cinza escuro e preto, respectivamente) quando somadas, não sofreu alteração, ou mesmo diminuiu no grupo pós-tratamento, em relação ao grupo AT, exceto para as frações PH8P (68% AT e 73% PT) e PH8S (53% AT e 67% PT). No caso do grupo controle, estes 3 fenótipos contribuem com cerca de 70% da resposta imune Th1 total, com exceção do extrato total LbT (45%).

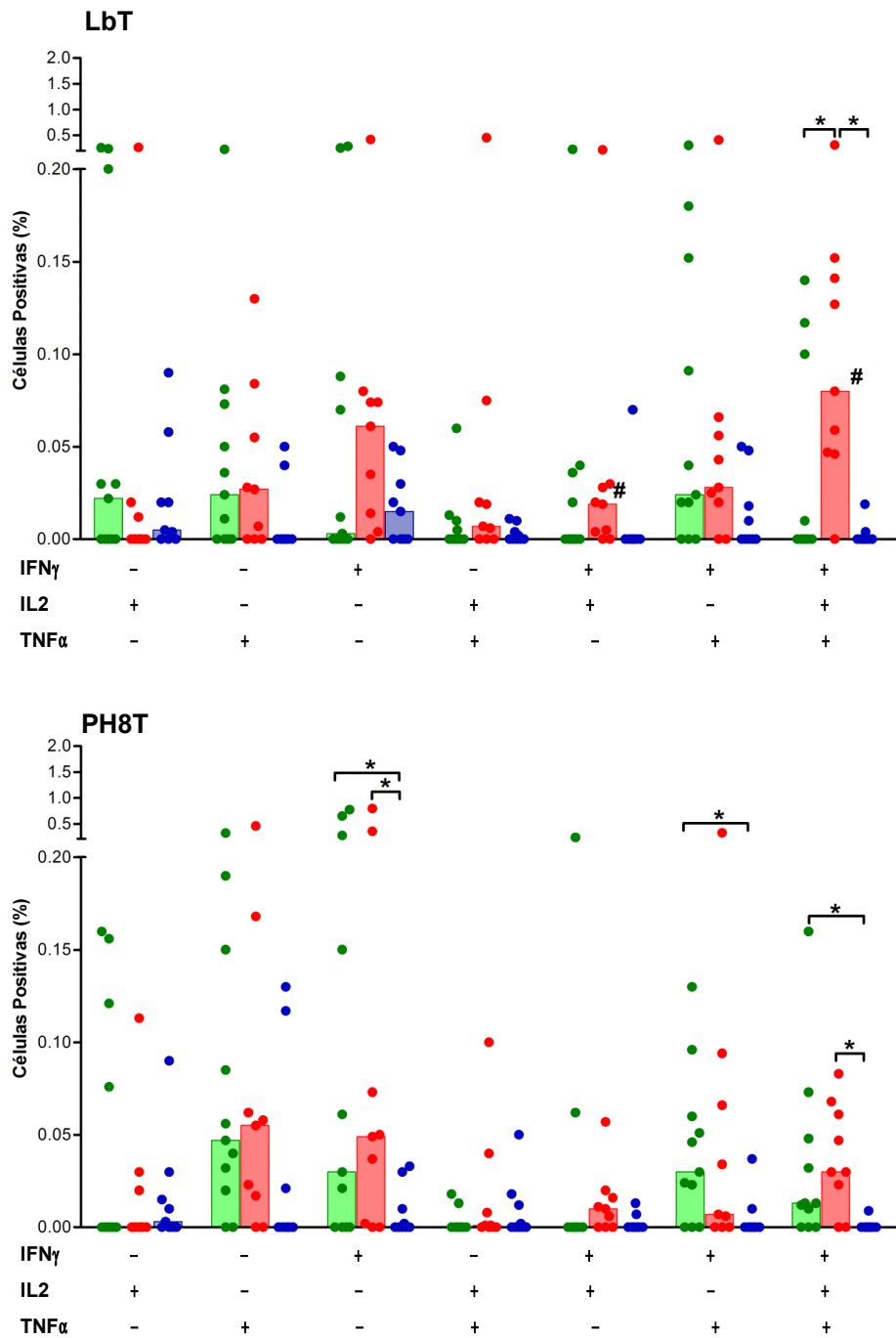


Figura 4.10: Percentuais de células T CD4+ produtoras de 3, 2 ou uma única citocina após estimulação com os extratos totais LbT e PH8T. As barras mostram as medianas e os pontos os valores individuais dos grupos de pacientes antes (verde) e pós-tratamento (vermelho) e do grupo controle (azul)
 * Mann-Whitney $p < 0,05$. # LbT > PH8T Wilcoxon $p < 0,05$.

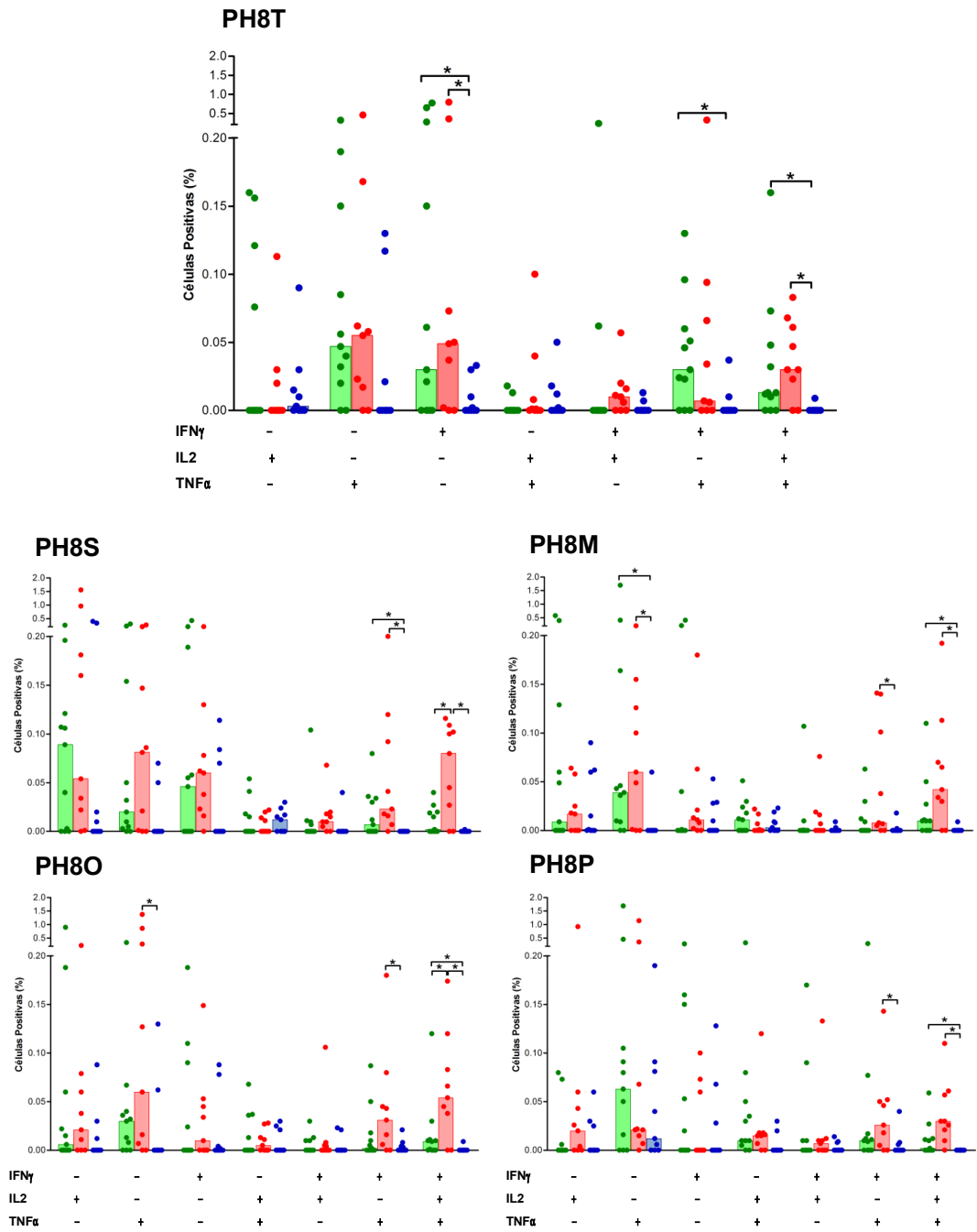


Figura 4.11: Percentuais de células T CD4+ produtoras de 3, 2 ou uma única citocina, após estimulação com os extrato total (PH8T) e as frações antigênicas de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8). As barras mostram as medianas e os pontos os valores individuais dos grupos de pacientes antes (verde) e pós-tratamento (vermelho) e do grupo controle (azul)

* Mann-Whitney $p < 0,05$.

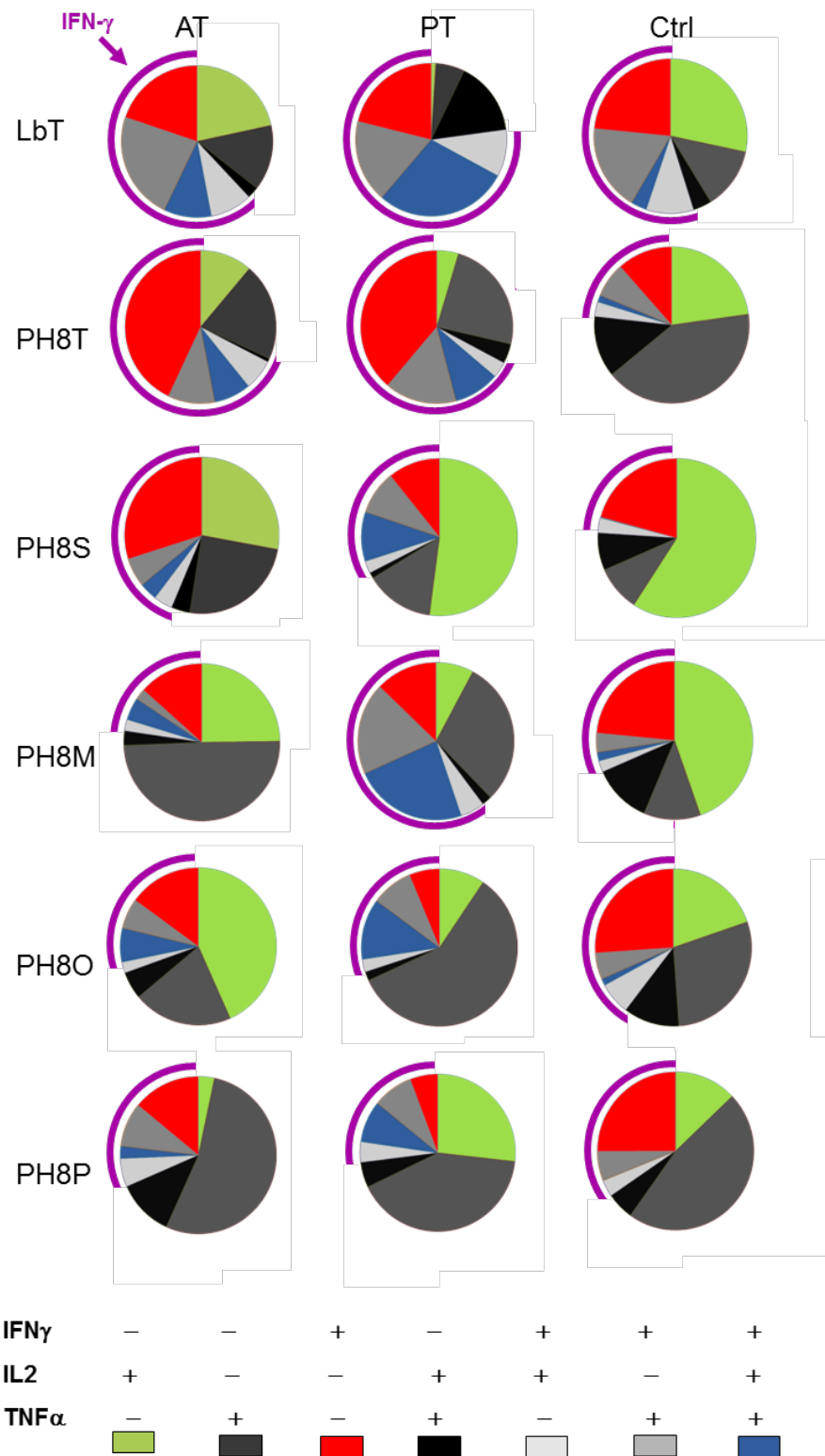


Figura 4.12: Contribuição (proporções) de cada fenótipo de células produtoras de citocinas para na resposta imune do tipo Th1, avaliada após estimulação de células mononucleares de sangue periférico com os extratos totais LbT e PH8T, e frações antigênicas de *L. (L.) amazonensis*, no grupo de pacientes antes do tratamento (AT); no grupo de pacientes pós-tratamento (PT) e indivíduos controles saudios (Ctrl). As linhas roxas mostram a resposta imune total de IFN- γ .

4.6.2. Células CD8⁺

A estimulação com os extratos totais (**Figura 4.13**) e as frações de *L. (L.) amazonensis* (**Figura 4.14**) de maneira geral, não foram capazes de induzir, ou induziram um percentual muito baixo de células dupla positivas e multifuncionais. De uma maneira geral, há um predomínio de células simples produtoras de IL-2, TNF- α ou IFN- γ . As células T CD8⁺ efetoras (simples produtoras de IFN- γ) tendem a aumentar seus percentuais após o tratamento (com exceção da fração PH8P); porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa para nenhum estímulo testado.

Quando os resultados foram avaliados com relação à contribuição de cada fenótipo na resposta imune CD8 estudada, o predomínio de células simples positivas para cada uma das 3 citocinas ensaiadas torna-se mais evidente (**Figura 4.15**). Novamente, podemos notar que, de maneira geral, as células simples positivas para IFN- γ tendem a aumentar sua contribuição após o tratamento. Inversamente, podemos observar uma diminuição na proporção de células simples produtoras de IL-2 ou de TNF- α . PH8T foi o estímulo com a maior proporção de células IFN- γ ⁺, tanto no grupo de pacientes AT, quanto no grupo PT. No caso das células simples produtoras de IL-2, observa-se que a maior contribuição deste tipo celular ocorreu após estimulação com a fração PH8M, nos dois grupos de pacientes estudados. Os fenótipos de células T CD8 dupla positivas ou multifuncionais, parecem contribuir melhor na resposta imune CD8 no grupo controle (principalmente, com relação às células duplo positivas para IL-2 e TNF- α). Vale ressaltar, porém, que os percentuais de células positivas para citocinas no grupo controle foram extremamente baixos.

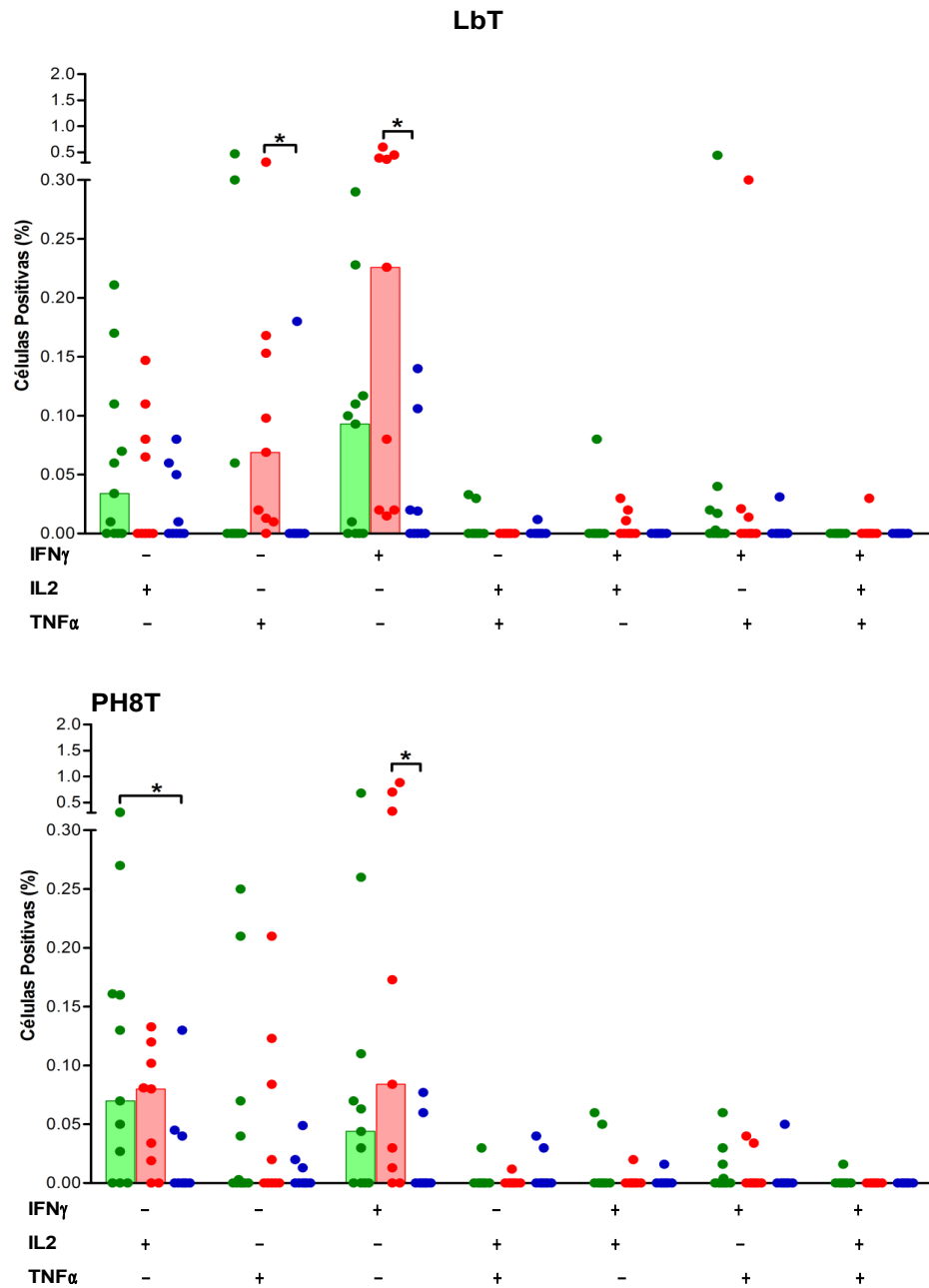


Figura 4.13: Percentuais de células T CD8+ produtoras de 3, 2 ou uma única citocina após estimulação com os extratos totais LbT e PH8T. As barras mostram as medianas e os pontos os valores individuais dos grupos de pacientes antes (verde) e pós-tratamento (vermelho) e do grupo controle (azul)

* Mann-Whitney $p < 0,05$.

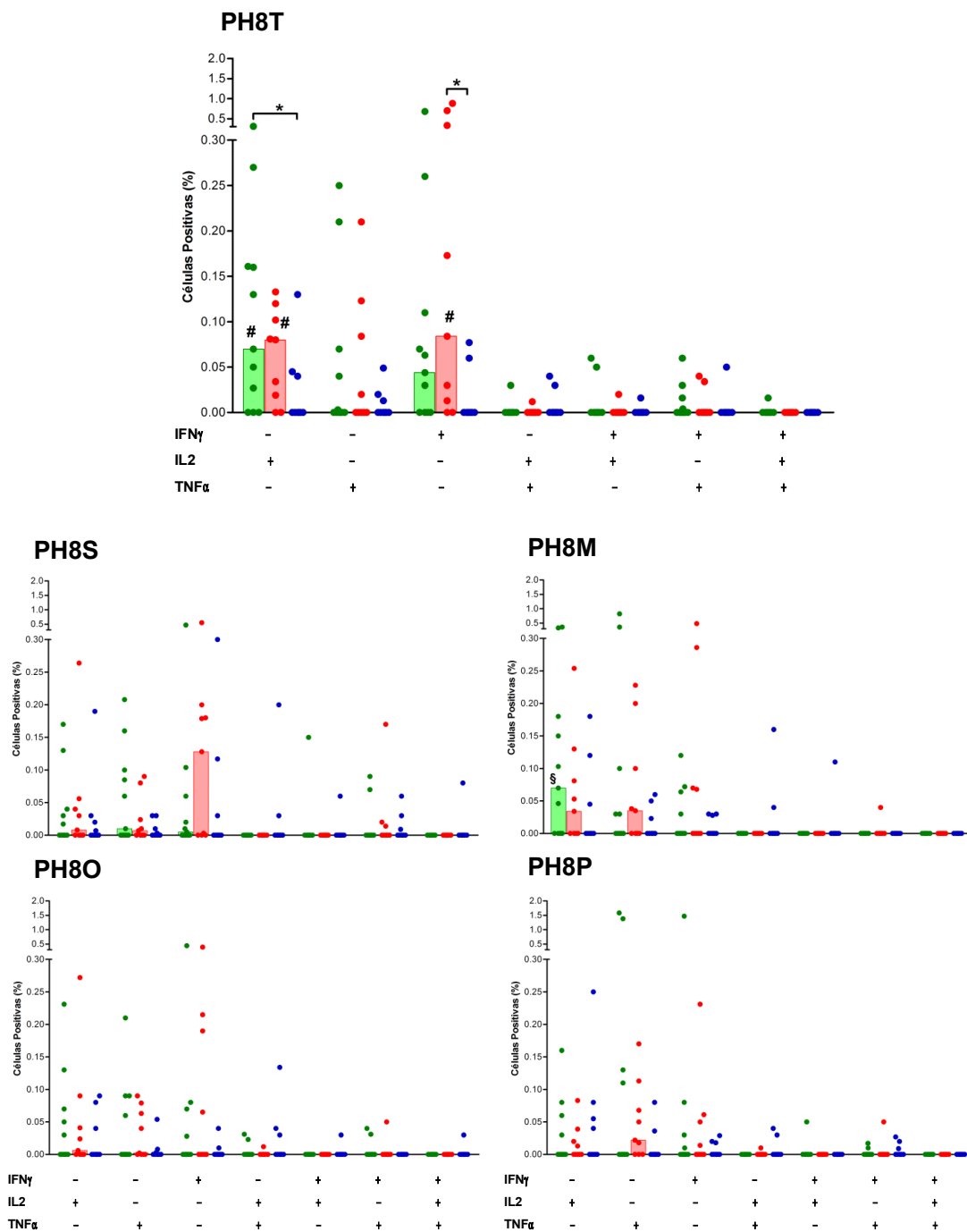


Figura 4.14: Percentuais de células T CD8+ produtoras de 3, 2 ou uma única citocina, após estimulação com os extrato total (PH8T) e as frações antigênicas de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P). As barras mostram as medianas e os pontos os valores individuais dos grupos de pacientes antes (verde) e pós-tratamento (vermelho) e do grupo controle (azul)

* Mann-Whitney $p < 0,05$; # PH8T > PH8P Wilcoxon $p < 0,05$; □ PH8M > PH8O e PH8P Wilcoxon $p < 0,05$.

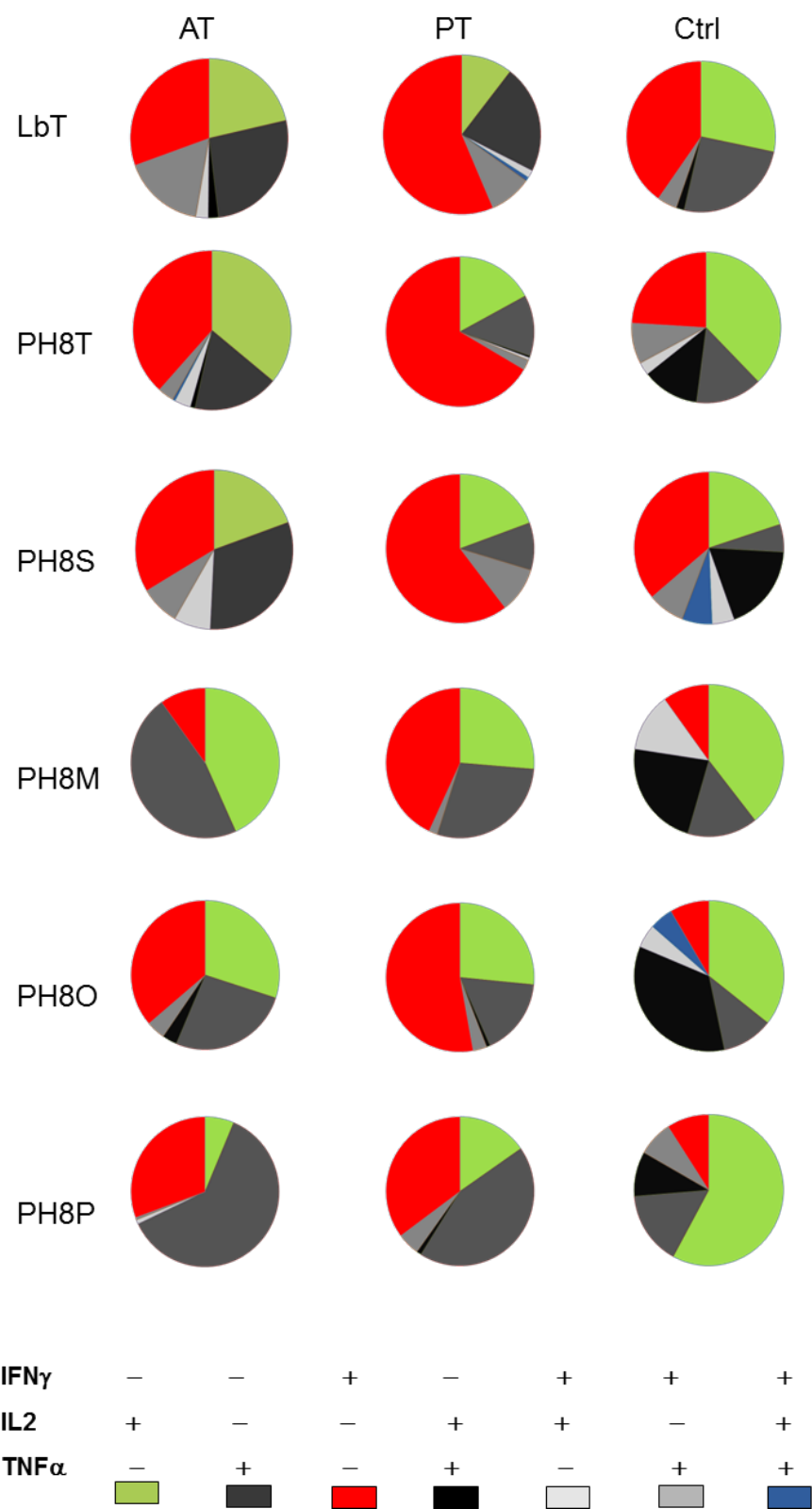


Figura 4.15: Contribuição (proporções) de cada fenótipo de células produtoras de citocinas para na resposta imune de linfócitos T CD8+, avaliada após estimulação de células mononucleares de sangue periférico com os extratos totais LbT e PH8T, e frações antigênicas de *L. (L.) amazonensis*, no grupo de pacientes antes do tratamento (AT); no grupo de pacientes pós-tratamento (PT) e indivíduos controles saudáveis (Ctrl).

4.7. Avaliação da produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 pelos fenótipos de células CD4+ Th1 através da intensidade média de fluorescência (MFI)

No modelo de diferenciação das células Th1 proposto por alguns autores (Fouods et al., 2006; Seder, 2008), um dos fatores que tornam as células multifuncionais tão competentes para a função efetora de longa duração seria a sua capacidade de produzir citocinas de maneira eficiente. Para avaliar esta possibilidade no nosso sistema, analisamos as médias de intensidade de fluorescência (MFIs) das 3 citocinas Th1 avaliadas, em cada fenótipo funcional, já que as MFIs seriam um reflexo direto da maior ou menor produção destes fatores solúveis pelas células T CD4+. Como o maior percentual das células multifuncionais foi observado no grupo de pacientes após o tratamento, comparamos as MFIs de cada citocina, dentro de cada fenótipo, apenas neste grupo.

Os resultados expostos na **tabela 4.1** demonstram que as células tripla positivas possuem MFIs significativamente maiores para todas as 3 citocinas estudadas, quando comparadas aquelas obtidas com as células simples positivas ($p < 0,05$).

Passamos em seguida a avaliar brevemente os resultados que consideramos mais interessantes para cada citocina.

4.7.1 MFI de IFN- γ

Observamos que as células multifuncionais foram as maiores produtoras de IFN- γ , em comparação às células dupla positivas e produtoras de uma única citocina frente a todos os estímulos, com exceção da fração PH8T, na qual esta diferença foi estatisticamente significativa apenas em relação às células simples positivas, e a fração PH8M em que não houve diferença significativa com relação as células IFN- γ +TNF- α .

O extrato total LbT foi o estímulo que mais induziu a produção de IFN- γ pelas células tripla positivas, sendo estatisticamente significativo em relação a PH8T (teste Wilcoxon: $p = 0,03$).

4.7.2 MFI de TNF- α .

Entre as células produtoras de TNF- α , as que obtiveram maior MFI para esta citocina foram as células multifuncionais. Todas as MFIs para TNF- α de células multifuncionais foram maiores do que as células produtoras somente de IL-2⁺, para todos os estímulos avaliados, com diferenças estatisticamente significantes.

Na resposta ao extrato total LbT, tanto as células multifuncionais, quanto as células produtoras de duas citocinas, produzem mais TNF- α ⁺ do que as células simples produtoras de TNF- α (Wilcoxon: $p < 0,05$). Com relação as frações de *L. (L.) amazonensis*, também observamos diferença estatisticamente significativa entre as células multifuncionais, quando comparadas às células TNF- α ⁺IL-2⁺ após estimulação com PH8S. Sob o estímulo PH8M, as células multifuncionais obtiveram MFI para TNF- α superior àquela das células produtoras de IFN- γ e TNF- α simultaneamente. Este último fenótipo, por sua vez, apresentou MFI para a referida citocina superior aquela das células simples positivas para TNF- α . Em relação à fração PH8O, as células multifuncionais obtiveram uma MFI para TNF- α estatisticamente mais elevada do que frente a todos os outros fenótipos de células T CD4⁺ produtoras desta citocina.

4.7.2 MFI de IL-2.

Assim como as duas citocinas mencionadas anteriormente, as MFIs das células produtoras de IL-2 foram mais elevadas nas células multifuncionais, do que naquelas com os fenótipos de duplas e simples positivas (Wilcoxon: $p < 0,05$).

No estímulo LbT, as células simples positivas para IL-2 apresentaram a menor MFI, com relação aos outros 3 fenótipos avaliados (TNF- α ⁺IL-2⁺, IFN γ ⁺IL-2⁺, IL-2⁺), sendo que em todos os casos, as diferenças foram estatisticamente significantes.

Com relação ao extrato total PH8T, observa-se que as células produtoras de duas e três citocinas possuem maiores MFIs do que as células simples produtoras de IL-2⁺, mas esta diferença foi significativa apenas em relação às células multifuncionais (Wilcoxon: $p < 0,05$). Observamos também que, após estímulo com todas as frações de *L. (L.) amazonensis*, as MFIs de IL-2 nas células tripla positivas também foram mais elevadas do que nas duplas IFN γ ⁺IL-2⁺, com exceção da fração PH8P.

Tabela 4.1: Média de intensidade de fluorescência (MFI) de IFN- γ , TNF- α e IL-2 das células CD4+produtoras de uma, duas ou três citocinas nos pacientes do grupo pós-tratamento. Os resultados estão expressos em mediana e entre parêntesis os quartis 25% e 75% .

	MFI IFN- γ				MFI TNF- α				MFI IL-2			
	Triplio+	IFN- γ TNF- α ⁺	IFN- γ IL-2 ⁺	IFN- γ ⁺	Triplio+	IFN- γ TNF- α ⁺	TNF- α IL-2 ⁺	TNF- α ⁺	Triplio+	IFN- γ IL-2 ⁺	TNF- α IL-2 ⁺	IL-2 ⁺
LbT	1750 (637; 2139)	207 (72,4; 688,)	53 (7,5; 377)	0,1 (0;49)	49,4 (20; 66)	16 (7,2; 76,8)	8,5 (2; 27,5)	0 (0; 2,6)	301 (154;505)	46 (1; 129)	75 (7; 141)	0 (0; 4,5)
PH8T	403 (54,5; 1045)	16 3 (0;1041)	8 (0; 114,5)	0,9 (0;30,5)	20 (6; 45,7)	15,7 (0; 40)	3 (0; 34,5)	0 (0; 5)	131 (27; 385)	9,7 (0; 109)	0 (0; 59)	0 (0; 12)
PH8S	982 (156; 1640)	117 (0;544)	12 (0;161)	0,4 (0,4; 53)	*34,3 (17,5; 51,1)	10 (5,8; 28,5)	*0 (0; 8,8)	0,7 (0; 10)	#207 (59;255)	#7,6 (0; 59)	17 (0; 59)	2 (0;12)
PH8M	518 (133; 1938)	25 (0; 321,5)	0 (0; 158)	0,6 (0; 40)	*24 (8,5; 46,2)	*2,8 (0; 15,2)	0 (0; 8,9)	0 (0; 0,1)	#254 (62; 385)	#0 (0; 270)	12 (0; 270)	0 (0; 5)
PH8O	998 (318;1742)	57 (0; 521)	0 (7,1;)	2 (0;13)	26 (10;)	0 (0; 20)	1 (0;)	0 (0;)	#226 (48; 411)	#0 (0;)	0 (0;)	0 (0; 0)
PH8P	793 (371;1437)	140 (5; 854,5)	11 (0;77)	0,8 (0;23,5)	19,5 (11; 49)	4 (0; 15)	9 (0; 26)	0 (0; 1,6)	229 (83; 349)	2 (0; 88,5)	34 (11; 155)	11 (0; 68,5)

■ MFI tripla positivas > MFI todos os outros 3 fenótipos (Wilcoxon: p<0,05)

■ MFI > MFI células simples positivas (Wilcoxon: p<0,05)

* MFI tripla positivas > MFI fenótipo dupla positivas (Wilcoxon: p<0,05)

MFI tripla positivas > MFI IFN γ IL2⁺(Wilcoxon: p<0,05)

4.8 Análise quantitativa da produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas estimuladas com os antígenos totais LbT e PH8T, e com as frações antigênicas de *L. (L.) amazonensis*.

A concentração de IFN- γ detectada nos sobrenadantes das células cultivadas com os extratos e frações foi significativamente maior no grupo de pacientes, tanto AT quanto PT, em comparação ao grupo controle (Mann-Whitney: $p < 0,05$) (**Figura 4.16**). Aparentemente, existe uma tendência das concentrações de IFN- γ produzidas pelas células dos pacientes PT a ser superior àquelas observadas no grupo AT. Porém, somente as diferenças entre os grupos estimulados com as frações PH8M e PH8P foram significativas ($p = 0,014$ e $p = 0,041$, respectivamente).

Na comparação entre os diferentes estímulos, o extrato total LbT induziu níveis significativamente maiores desta citocina do que todos os demais estímulos testados, tanto no grupo de pacientes antes, como pós-tratamento (Wilcoxon: $p < 0,05$) (**Figura 4.16**). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no grupo controle após estimulação com todos os antígenos.

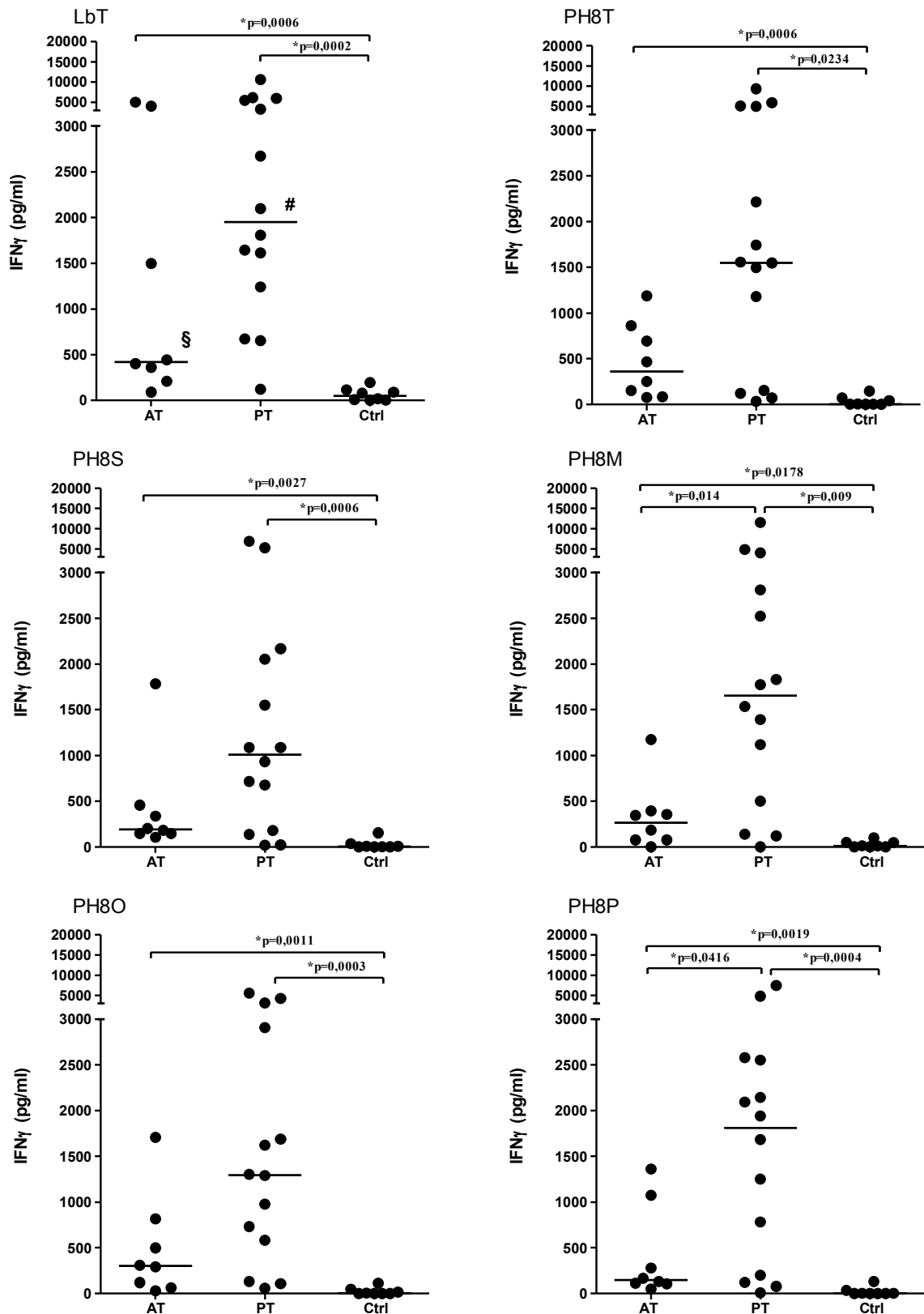


Figura 4.16: Níveis de IFN γ (pg/ml) detectados nas culturas de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com os antígenos totais LbT e PH8T e as diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl), pela técnica de ELISA. As linhas horizontais indicam os valores da mediana de cada grupo. * Mann-Whitney $p < 0,05$. #, § Wilcoxon $p < 0,05$ LbT > todos os outros estímulos.

5. DISCUSSÃO

As leishmanioses estão incluídas no grupo de “doenças negligenciadas”, consideradas pela Organização Mundial de Saúde um grave problema de saúde pública (WHO, 2002). Como referido anteriormente, as estratégias de controle se tornam complicadas devido à ecologia do parasito e, por isso, o desenvolvimento de uma vacina é considerada a medida profilática mais indicada para o controle da doença. Apesar de inúmeros esforços para se compreender a biologia dos vários parasitas causadores das leishmanioses, as causas das diferentes manifestações clínicas, as moléculas e células envolvidas na resposta imunológica do hospedeiro, e aquelas relacionadas com o combate à infecção, em muitos aspectos ainda não foram totalmente esclarecidos. A estratégia atualmente adotada para se desenvolver uma vacina efetiva contra as leishmanioses, envolve a compreensão dos fatores que regulam e participam na proteção durante e após a infecção natural (Okwor & Uzonna, 2008).

Sabe-se que os linfócitos T possuem um papel crucial na proteção contra várias infecções causadas por parasitas intracelulares, incluindo as leishmanioses (Heralth et al., 2003). Essas células possuem atividades funcionais heterogêneas, e medeiam seus efeitos por uma variedade de mecanismos (Watchmaker et al., 2008; Zaragoza et al., 2011; Uchida, 2011; Ahlers & Belyakov, 2010). É comum encontrarmos trabalhos em que a resposta imune do tipo Th1, potencialmente protetora contra a doença, é avaliada exclusivamente pela sua magnitude, através da frequência de células específicas para antígenos do parasita, ou pela produção *in vitro* de IFN- γ (Mendonça et al., 1995; De Luca et al., 1999; Elias et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Vélez et al., 2005). Porém, em muitos casos, tanto no modelo experimental, como na doença humana, apesar da evidenciação da produção desta citocina, seja pela frequência de células produtoras, ou pela quantificação da citocina *in vivo* ou *in vitro*, não se observa uma correlação direta com a proteção (Gicheru et al., 2001; Anderson et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Vélez et al., 2005; Darrah et al., 2006; Okwor et al., 2008). Desta forma, a magnitude de uma resposta imune celular medida por um parâmetro único não reflete o seu potencial total, já que existem diversos parâmetros para serem analisados durante uma resposta imunológica, como citocinas dos tipos Th1 e Th2, moléculas de superfície, receptores de quimiocinas e citocinas, etc.

É a partir desse ponto de vista que alguns autores vêm buscando biomarcadores, através da análise de múltiplos parâmetros, na tentativa de obter correlatos com a clínica do paciente, ou a proteção conferida por um candidato vacinal. Para tuberculose, o diagnóstico utilizado através da mensuração da citocina IFN- γ , não distingue infecção e doença, por isso tem sido desconsiderado, já que a avaliação de outras citocinas em conjunto têm demonstrado uma melhor correlação com as fases da doença (Sutherland et al., 2010). Acredita-se que os

imuno-marcadores tenham potencial na determinação de células T que se correlacionam com a proteção na doença (Parida & Kaufmann, 2010). Esforços semelhantes também estão sendo empregados em outras doenças infecciosas, como HIV e malária (Harari et al., 2011; Erdman et al., 2011)

Neste sentido, métodos que melhor definam as características funcionais de uma resposta imunológica são de extrema importância para se delinear correlatos de proteção e, conseqüentemente, avaliar antígenos, adjuvantes e novas estratégias de vacinação. Atualmente, a citometria de fluxo é o único método que caracteriza simultaneamente múltiplas funções, permitindo uma avaliação mais ampla da magnitude, fenotipagem e capacidade funcional, a nível de uma única célula (Perfetto, 2004).

No presente estudo, avaliamos, por parâmetros qualitativos e quantitativos, a resposta imune celular induzida por extratos totais de formas promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, e por frações enriquecidas em componentes celulares de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Sendo a *L. (V.) braziliensis* uma espécie endêmica no estado do Rio de Janeiro desde o final do século XIX (Rabelo, 1913), e como todos os pacientes avaliados são provenientes de municípios do estado, possivelmente todos foram infectados por esta espécie do parasita (Rabelo, 1913; Vieira-Gonçalves, 2008).

Para realizar o estudo, foram elaborados ensaios de citometria de fluxo multiparamétrica para identificar, quantitativamente e qualitativamente, subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 produtores de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10 em PBMCs de pacientes com a doença ativa, antes de receberem a terapia antimonial, e pacientes curados após 140 dias do término do tratamento e, como controle, utilizamos células de indivíduos saudáveis, sem história prévia de infecção por *Leishmania*. Também foi realizada uma análise da produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas de PBMCs estimuladas *in vitro* com os antígenos do parasita, através da técnica de ELISA, na tentativa de confirmar os resultados encontrados pela citometria de fluxo.

O primeiro passo do estudo foi confirmar se a técnica de ultracentrifugação e preparo das frações foi bem sucedida, através da observação em microscopia eletrônica de transmissão de seções ultrafinas das frações antigênicas de *L. (L.) amazonensis*. Não foi possível processar a fração solúvel PH8S, pois como o seu próprio nome diz, devido à presença de componentes solúveis que não precipitam mesmo após ultracentrifugação a 100.000g por 1 hora, não houve material suficiente para emblocar e visualizar na microscopia (Comunicação pessoal, Dr^a Mirian Pereira, Laboratório de Ultraestrutura Celular do IOC/Fiocruz).

As imagens obtidas com as frações PH8M, PH8P e PH8O demonstraram abundância de material eletrondenso e componentes relacionados, conforme suas denominações: estruturas

com morfologia semelhantes à membrana, alta densidade de componentes particulados do extrato total e estruturas que se assemelham às presentes no conteúdo intracelular, como microtúbulos e organelas. Por outro lado, também foi possível constatar que as frações não são altamente purificadas, pois em comparação às imagens de frações obtidas por outros grupos, acreditamos que existam “contaminantes” celulares entre as frações que somente marcadores enzimáticos específicos de estruturas ou organelas poderiam definir (Souza & Cunha-e-Silva, 2003). Existem relativamente poucos relatos sobre o isolamento de estruturas e organelas de protozoários, devido à fatores como dificuldade em obtenção de células suficientes para o procedimento de fracionamento e desfragmentação da célula, de forma a manter as estruturas intactas, principalmente no caso dos protozoários, que são mais resistentes à ruptura, como os tripanossomatídeos (Souza & Cunha-e-Silva, 2003). Alguns grupos conseguiram obter frações subcelulares altamente purificadas, com objetivo de realizar caracterizações ultraestruturais (Cunha-e-Silva et al., 1989; Dwyer, 1980). Em nosso estudo, apesar das frações avaliadas não estarem com um grau de pureza elevado, fomos capazes de obter diferenças na qualidade da resposta imune do tipo Th1, induzida por cada uma delas, em relação ao extrato total de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (PH8T).

A análise das populações de linfócitos T CD4 por citometria de fluxo, revelou percentuais semelhantes dessas células, quando comparados entre os grupos AT, PT e controle, e também entre os percentuais induzidos pelas diferentes frações e extratos totais. Ou seja, os estímulos não induziram diferenças na frequência dos linfócitos CD4⁺. Quando comparados entre si, os estímulos também não induziram percentuais diferentes de células CD8⁺, mas quando foi feita a comparação entre os grupos, observou-se que há uma tendência ao aumento dessas células nos pacientes curados, em relação aos pacientes com a doença ativa, apesar de não existir diferença estatisticamente significativa. Na literatura, blastos de célula T reativos à antígenos totais de *L. (V.) braziliensis* em pacientes com LTA, demonstraram um aumento dos percentuais de células T CD8⁺ reativas ao antígeno de *Leishmania* após o tratamento antimonial, com as células T CD4⁺ mantendo percentuais semelhantes, ou ligeiramente menores (Da-Cruz et al., 2002). Como nosso trabalho utiliza culturas de curto período (cerca de 16 horas), essa poderia ser uma explicação plausível para o fato de, apesar da tendência ao aumento do percentual de células CD8, esta não ter apresentado significância estatística.

Por outro lado, em relação à ausência de alteração nos percentuais de células T CD4⁺, nossa expectativa não era a de que estes números seriam alterados, mas seriam a magnitude da resposta imune mediada por citocinas e, principalmente, a qualidade das respostas imunes que apresentariam diferenças entre os grupos estudados, e também entre os estímulos,

principalmente com relação aos extratos totais de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, já que existe uma grande possibilidade de que a totalidade dos pacientes estudados tenham sido infectados por esta última espécie do parasita.

Os percentuais de células CD4⁺CD25⁺ não apresentaram diferenças significativas em nenhum tipo de comparação, apesar de existir uma tendência de serem mais frequentes no grupo dos pacientes (ambos AT e PT), em comparação ao grupo controle. Estas células não demonstraram serem produtoras de IL-10 através da marcação intracelular para a citocina em questão. Portanto, a fonte de IL-10 nesses pacientes não parecem ser as células regulatórias e nem de células CD4⁺CD25⁻ e CD8⁺CD25⁻. Anderson e colaboradores (2007) observaram na leishmaniose crônica experimental que a maior fonte de IL-10 não eram as células T reguladoras naturais, mas sim células CD4⁺CD25⁻. Avaliando a iMFI das células CD4 e CD8 produtoras de IL-10 entre os grupos, não foi possível observar uma correlação entre o processo de cura dos pacientes, com a produção dessa citocina, a qual de acordo com a literatura, estaria controlando o processo inflamatório para permitir a epitelização das lesões (Antonelli et al., 2004). Talvez a IL-10 provenha de monócitos, e a inclusão de um marcador para este tipo celular (como para a molécula CD14) poderia nos ajudar a avaliar esta possibilidade (Gaze, 2006).

Ao analisarmos os resultados da marcação intracelular, observamos que a frequência de células produtoras de cada citocina, individualmente analisada, não variou muito entre as amostras que receberam os diferentes estímulos; porém, muitas vezes amostras com percentuais semelhantes possuíam intensidades de fluorescência muito diferentes, ou vice-versa. Desta forma, para melhor avaliar a qualidade da resposta imune induzida pelas frações e extratos totais, utilizamos uma medida chamada Intensidade Média de Fluorescência integrada (traduzida de iMFI). A iMFI integra duas medidas de avaliação da resposta imune: a frequência e sua intensidade. A mesma vem sendo sugerida na literatura como um melhor preditor da efetividade de uma vacina (Darrah et al., 2007; Huaman et al., 2009). Obtivemos esta medida multiplicando-se a frequência de células produtoras de uma citocina particular, pela sua MFI (intensidade média de fluorescência) na mesma amostra, e subtraímos pela iMFI obtida nas células que não receberam estímulo. Assim, selecionamos somente as células respondedoras aos antígenos de *Leishmania*, ou seja, as células específicas.

Mesmo com a utilização da iMFI, as diferenças entre os estímulos não foram bem evidenciadas. As células produtoras de citocinas apresentaram uma variação significativa entre os pacientes, principalmente no grupo AT, os quais possivelmente, devido ao pequeno tempo de evolução da doença (2,5 meses), ainda não montaram uma resposta imune do tipo Th1 pró-inflamatória suficientemente robusta no controle da carga parasitária, havendo raras

diferenças significativas em comparação ao grupo controle. Por outro lado, existiram diferenças significativas entre os grupos de pacientes PT e controle, submetidos à mesma estimulação, indicando maior maturidade da resposta imune, e células respondedoras específicas para a maior parte dos antígenos de *Leishmania* testados. Assim, foram encontradas diferenças significantes nas iMFIs de citocinas Th1 não só com o antígeno LbT, mas com o extrato total de *L. (L.) amazonensis* e suas frações, indicando que os pacientes curados, que foram presumivelmente infectados por uma espécie não-homóloga, apresentaram células respondedoras aos antígenos de *L. (L.) amazonensis*. Porém, não fomos capazes de evidenciar diferenças entre as respostas desencadeadas pelos diferentes estímulos testados, quando analisamos cada estímulo dentro de cada grupo (AT, PT e controle).

As células T CD8⁺ produtoras de citocinas, apresentaram diferenças estatisticamente significantes sob estimulação com LbT quando o grupo de pacientes PT foi comparado ao grupo controle. Ainda não se sabe claramente como as células CD8⁺ seriam ativadas na infecção por *Leishmania*, já que este é um parasito intracelular que infecta células do sistema fagocítico mononuclear, e reside no interior do fagolisossoma das mesmas, levando ao processamento de antígeno para a via de apresentação de MHC classe II. Mas é certo que tais células estão associadas com a proteção e cura da leishmaniose cutânea, tanto em humanos, quanto em camundongos (Ruiz & Becker, 2007). Foi relatado que células CD8⁺IFN- γ ⁺ contribuem para a proteção em longo prazo (cerca de um ano após o aparecimento das lesões) em indivíduos com histórico de LC (Rostami, 2010). Nossos resultados corroboram esses achados, pois os pacientes que se curaram exibiram maiores iMFIs para a citocina, no caso do estímulo LbT, comparado ao grupo controle. Já as iMFIs de células CD8⁺IL2⁺ são maiores no grupo de pacientes AT do que no grupo controle, sendo provável que essas células dos pacientes AT ainda estejam em um estágio inicial de diferenciação, tendo entrado em contato com o antígeno parasitário mais recentemente, e ainda não completaram seu desenvolvimento para uma resposta imune do tipo Th1 efetora. No caso dos indivíduos controles, seria a primeira vez na qual as células *Leishmania* específicas estariam entrando em contato com antígenos do parasita.

Como referido, a citometria de fluxo multiparamétrica possibilita a avaliação simultânea de vários parâmetros fenotípicos, e de resposta funcional em nível de uma única célula, com a produção de várias citocinas. Através dessa abordagem, a qualidade da resposta imune do tipo Th1 vem sendo relacionada com um espectro de diferenciação baseada na produção de citocinas, que se inicia com células IFN- γ , produtoras de IL-2 e/ou de TNF- α (provavelmente células de memória central, ou células ativadas no início da diferenciação Th1), passando por um fenótipo multifuncional IFN- γ ⁺IL2⁺TNF- α ⁺ ou IFN- γ ⁺ IL2⁻ TNF- α ⁺

(provavelmente células de memória efetora), até células efetoras, em fase final de diferenciação, que são simples positivas para IFN- γ . A produção de IL-2 e TNF- α , associada à produção de IFN- γ , oferece maior capacidade proliferativa e função efetora às células multifuncionais, conferindo as mesmas, função efetora de longa duração (Seder et al., 2008). Além disso, quando a produção de citocinas é avaliada de forma semi-quantitativa utilizando-se a MFI, foi demonstrado que as células multifuncionais produzem consideravelmente mais citocinas, do que as simples positivas (Darrah et al., 2007; ☆❁■❁❁■❁❁■❁▼♯ 2007).

Nesse modelo de diferenciação linear, a célula T CD4⁺ pode nem sempre passar por cada um destes estágios, podendo acontecer de uma célula IL-2⁺ passar diretamente para o fenótipo IFN- γ ⁺IL-2⁺ até IFN- γ ⁺ após o primeiro contato com o antígeno, particularmente se o estímulo for forte (Whu et al., 2002). Assim, pode-se desencadear uma resposta imune do tipo Th1 com predominância de células efetoras que produzem somente IFN- γ . Em nosso estudo, um exemplo desta relação entre a intensidade do estímulo e a diferenciação da célula Th1 pode ser dado com o mitógeno Concaivalina (Con) A, utilizada como controle positivo dos experimentos. Observamos que, após o estímulo com ConA, mais de 80% da resposta imune dos fenótipos de células avaliadas do tipo Th1 é composta por células simples produtoras de IFN- γ (resultados não mostrados). Desta forma, para se avaliar um candidato vacinal, ou mesmo um adjuvante, torna-se necessário avaliar não só a quantidade, mas também a qualidade da resposta imune por ele desenvolvida, levando em consideração todos os fenótipos celulares envolvidos. A avaliação dessas células durante a infecção natural, também é um parâmetro importante no entendimento de qual resposta imune seria realmente efetiva, seja na cura e na proteção contra infecções subseqüentes, com o mesmo patógeno ou com patógenos relacionados, de modo análogo ao caso de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

Estudos da qualidade da resposta imune do tipo Th1 durante a infecção pelo HIV mostraram que os indivíduos não-progressores, ou seja, os infectados que mantém as cargas virais baixas por longos períodos, apresentam proporções mais altas de células que expressam IL-2 e IFN- γ , enquanto nos denominados progressores, que possuem carga viral alta, estas células pertencem predominantemente ao fenótipo de célula efetora terminal, simples produtoras de IFN- γ (Younes, 2003). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que a frequência das células multifuncionais ou IL-2⁺IFN- γ ⁺ representa quase que 50% das respostas imunes Th1 total dos indivíduos em terapia antirretroviral e dos não-progressores (Kannanganat, 2007).

Em nossos ensaios, o estímulo que demonstrou induzir as maiores proporções de células multifuncionais em relação aos outros fenótipos de células produtoras de uma ou duas citocinas foi o extrato total LbT nos dois grupos de pacientes. Por outro lado, o extrato total de *L. (L.) amazonensis* (PH8T) induziu altas proporções de células IFN- γ^+ . Todos os estímulos testados aumentaram a proporção de células multifuncionais (IFN- γ^+ IL-2⁺TNF- α^+) dentre as células T CD4⁺ respondedoras após o tratamento, quando comparado às células respondedoras antes do tratamento, sendo que no extrato total PH8T este aumento foi de apenas 2% (**Figura 4.12**).

Supreendentemente, as frações de *L. (L.) amazonensis* não induziram respostas imunes qualitativas semelhantes ao do extrato total da espécie homóloga, não sendo esta também a soma das respostas observadas com as frações. Observa-se que a fração PH8M foi a que induziu maiores proporções de células multifuncionais nos pacientes PT depois do extrato total de *L. (V.) braziliensis*, e a qualidade da resposta imune evidenciada por PH8M foi muito distinta, quando comparada ao extrato total de *L. (L.) amazonensis*. A fração solúvel também induziu frequências mais altas de células multifuncionais no grupo PT em relação aos outros grupos.

Possivelmente, os antígenos estão combinados no extrato total PH8T de uma certa maneira que estimulam com maior intensidade as células T, induzindo diretamente altas proporções das células efetoras na fase final de diferenciação. Visto que a *L. (L.) amazonensis* causa a forma difusa de LTA, associada a uma ausência de resposta imune celular específica ao parasita, poderíamos nos perguntar, com base nesses resultados: esta ausência de resposta imune se deve a indução de anergia como já foi ora proposto (Pinheiro et al., 2004 e 2005) e/ou haveria algum componente envolvendo uma estimulação forte, capaz de levar estas células ao final da linha de diferenciação da resposta imune do tipo Th1, as células produtoras de IFN- γ ? Estudos relataram que o extrato total de *L. (L.) amazonensis*, da mesma cepa utilizada em nosso estudo, é capaz de induzir apoptose e supressão da proliferação de células de linfonodo de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis*, enquanto que o extrato total de *L. (V.) braziliensis* (semelhante ao nosso LbT), não interferiu na proliferação celular, quando comparado ao controle sem nenhum estímulo adicionado à cultura (Pinheiro et al., 2004).

Nos pacientes do grupo antes do tratamento, assim como nos indivíduos controle, existe uma porção grande de células produtoras de IL-2, TNF- α , IL-2⁺TNF- α^+ . Tem sido sugerido que estas células estão no início da diferenciação, e também podem ser células de memória central, capazes de sofrer rápida proliferação e diferenciação após uma segunda exposição ao agente infeccioso (Fouds et al., 2006). Esses resultados são extremamente

coerentes com os achados de iMFI para IL-2, já discutidos anteriormente, e indicam novamente primeiro contato com o antígeno no grupo de indivíduos controle sadios, e no grupo de pacientes antes do tratamento.

Cacamo e colaboradores (2010) avaliaram os sete fenótipos de células CD4+ específicas para *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes na fase ativa, latente da doença e pacientes após a antibioticoterapia. Porém seus resultados são diferentes em relação aos nossos, bem como ao que tem sido proposto pela literatura, incluindo ensaios de proteção com antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* que correlacionaram a proteção com a maior proporção de células multifuncionais (Linderstrom et al.,2009; Derrick et al.,2011) já que os autores daquele trabalho encontraram as células multifuncionais nos pacientes com tuberculose ativa (80% dos pacientes), e a proporção dessas células são menores durante a fase latente, sendo observadas somente em 10% desses mesmos pacientes. É possível que os antígenos utilizados nos ensaios *in vitro* para a análise da produção de citocinas tenham provocado uma resposta de baixa proporção de células triplo-positivas com mais células com perfil efetor ou que ainda, alguma citocina regulatória, como TGF- β influencie na resposta imune dos pacientes na fase latente.

Corroborando os achados da literatura, nossos resultados das MFIs das células produtoras de três citocinas e as células que produzem uma ou duas citocinas, nos pacientes curados, demonstraram que, em relação à produção de IFN- γ , as células multifuncionais tiveram maior média em relação às outras células, em todos os estímulos, com diferenças extremamente significantes em relação as células simples produtoras de IFN- γ . As células multifuncionais também produzem mais IL-2 e TNF- α , demonstrado pelas diferenças estatisticamente significantes das MFIs em comparação com as células simples positivas (**Tabela 4.1**).

Analizamos também, de forma quantitativa, a produção de IFN- γ nos sobrenadantes de PBMCs de indivíduos pertencentes aos 3 grupos estudados, estimuladas com as frações e extratos totais. Observamos que LbT foi o estímulo que induziu as maiores concentrações de IFN- γ nos sobrenadantes, em comparação com os outros estímulos, nos grupos dos pacientes AT e PT. Esses resultados sugerem uma correlação com aqueles que obtivemos na análise da proporção de células multifuncionais, no qual LbT induziu a maior proporção de células triplo positivas, células essas que também possuem a maior MFI para IFN- γ , como relatado anteriormente. Infelizmente, devido ao número de células ser insuficiente para a realização das duas técnicas com amostras de um mesmo paciente, não foi possível confirmar essa correlação de maneira estatística. Resultados já publicados por nosso grupo (Telino et al., 2006), também demonstraram que o extrato total de *L. (V.) braziliensis* induziu maior

concentração *in vitro* de IFN- γ , do que o homólogo de *L. (L.) amazonensis* em células de pacientes com a doença ativa, e que todos os estímulos induziram níveis maiores da citocina, quando comparados aos controles sadios, assim como observado em nosso estudo.

Apesar de não termos encontrado diferenças estatisticamente significativas na produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas de PBMCs obtidas dos grupos de pacientes AT e PT (somente para PH8M e PH8P), existe uma tendência ao aumento da citocina nos pacientes PT, o que pode ser refletida também pelo aumento da proporção das células multifuncionais.

A manutenção de células T de memória é uma característica na proteção imune, e constitui um dos maiores objetivos das estratégias no desenvolvimento de vacinas (Esser et al., 2003). O “pool” de células T de memória serve como um depósito de células T específicas para um antígeno, que se “recordam” de encontros anteriores com este mesmo antígeno (Tanel et al., 2009). As células T de memória, desenvolvidas após a vacinação ou infecção natural, levam à geração de uma resposta imune protetora contra uma re-exposição ao patógeno, pela proliferação clonal rápida e ativação de funções efetoras (Tanel et al., 2009). Entretanto, no contexto de várias infecções, estas células T falham na persistência e morrem. Desta forma, torna-se importante entender os mecanismos pelos quais as células T de memória são geradas, para o desenvolvimento de estratégias racionais de vacinação, e o aperfeiçoamento de intervenções terapêuticas em infecções crônicas.

Em humanos e camundongos, as células de memória são divididas em central e efetora, de acordo com a capacidade migratória, localização e a função, de acordo com a produção de citocinas (Sallusto et al., 2004). Além da classificação baseada na produção de citocinas, existe a ordenação clássica, baseada em marcadores de superfície. Porém, frequentemente ocorre concordância entre as duas classificações (Whu et al., 2002). Segundo a literatura, as células no início do estágio de diferenciação produzem principalmente IL-2, e são células de memória central (Sallusto et al., 1999). Assim que a célula passa a produzir IFN- γ , ela perde a expressão de alguns marcadores de superfície (como o receptor de quimiocina CCR7), além de sua capacidade proliferativa, gerando células de memória efetora, que posteriormente passarão ao fenótipo de célula efetora (Sallusto et al., 1999).

Em nosso estudo, não utilizamos marcadores de superfície relacionados aos fenótipos de memórias central ou efetora (como CCR7, CD62L e CD45RA), mas estamos certos de que, incluindo estes marcadores em nosso painel de anticorpos, teremos uma resposta mais clara sobre a capacidade de memória dessas células. Desta forma, baseando-se somente na classificação envolvendo a produção de citocinas, nossos resultados com o antígeno total PH8T nos levam a imaginar que este estímulo não seria capaz de induzir a geração de células

de memória suficientes, e que assim não protegeria contra a infecção pelo parasita *L. (L.) amazonensis*. Atualmente, estamos realizando um ensaio de imunoproteção com as frações e os extratos totais, associados ou não à CpG ODN, um potente estimulador de resposta imune do tipo Th1, na tentativa de avaliar melhor essa intrigante possibilidade.

Tomados em conjunto, nossos resultados com os extratos totais de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) amazonensis* indicam que, células mononucleares de sangue periférico obtidas de indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis*, respondem qualitativamente diferente quando estimuladas com o antígeno homólogo, ou com uma espécie diferente do parasita, no caso também de outro subgênero. Poderia ser esta diferença um reflexo da fraca imunidade cruzada existente entre as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, muito bem estudada e descrita por vários autores (Lainson & Bray, 1966; Laison & Shaw, 1977; Porrozi et al., 2004; Tonui & Titus, 2007). Nossa intenção é a de futuramente investigar melhor esta questão, analisando as respostas imunes de pacientes infectados com *L. (L.) amazonensis*, estimuladas com o extrato total e com as frações subcelulares de espécie homóloga, e avaliando a resposta imune contra antígenos de outras espécies de *Leishmania*, nos pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis*, incluindo espécies do mesmo subgênero. Por outro lado, as semelhanças observadas na qualidade da resposta imune do tipo Th1 entre o estímulo com o extrato total LbT e a fração de membrana de *L. (L.) amazonensis*, principalmente no grupo de pacientes pós-tratamento, apontam para a possibilidade da existência de antígenos de membrana envolvidos na indução de células multifuncionais, e que possivelmente possuem reatividade cruzada entre espécies e subgêneros diferentes de *Leishmania*.

Com relação às células T CD8, as porções de células multifuncionais não foram evidenciadas, pois as mesmas foram escassas ou inexistentes. É possível que, no caso das células CD8⁺, o fenótipo multifuncional não tenha tanta importância na infecção contra a *Leishmania*, mas sim as células efetoras. O fato de mais de 50% das células CD8 específicas para os antígenos testados, induzidas após o tratamento, serem células simples produtoras de IFN- γ , não nos parece um fator negativo, já que é sabido que estas células auxiliam na resposta imune a patógenos intracelulares, não só por sua ação citotóxica, mas também pela ativação dos macrófagos infectados, através da produção desta citocina em particular (Rostami, 2010). Além disso, nem sempre existe uma associação entre a produção de IFN- γ e função citotóxica não ocorrendo uma relação direta entre essas duas características das células CD8⁺ com os fenótipos de memória central e efetora (Unsoeld et al., 2002; Flynn et al., 2009).

Mais de um modelo têm sido sugerido para estudar a relação entre as linhagens de célula T CD8⁺ de memória central, efetora e virgens após a estimulação antigênica, e como as células de memória são geradas. Grande parte deles estudam a geração dessas células em

infecções virais (Kaech et al., 2007). Wherry e colaboradores (2005) demonstraram que, após ativação, as células seguem um modelo de diferenciação linear, em que primeiramente são geradas células CD8⁺ efetoras que dão origem às células de memória efetora e de memória central. Um segundo modelo (Chang et al., 2007) descreve uma forma de diferenciação assimétrica, em que uma célula T virgem, quando ativada, dá origem simultaneamente a dois pólos diferentes de células filhas: um pólo com fenótipo de células de memória, e outro de células citotóxicas efetoras. Se nos basearmos no primeiro modelo, é possível que as células CD8⁺ simples produtoras de IFN- γ , respondedoras ao antígeno do parasita, evidenciadas no grupo de pacientes após o tratamento, possam originar células de memória central; porém, da mesma forma do que já foi relatado para as células CD4⁺, para avaliarmos de forma mais clara essa hipótese seria necessário a utilização de outros marcadores como CD62L e granzima B, além das citocinas avaliadas.

O presente estudo apresenta uma contribuição para o entendimento da imunopatogênese da leishmaniose tegumentar americana, e mostra a importância da avaliação de mais de um parâmetro, a nível de uma única célula, para o entendimento da resposta imune na infecção, corroborando a noção de que uma resposta imune do tipo 1 não pode ser medida exclusivamente pela produção, ou pelo número de células produtoras, de IFN- γ . Precisamos não só nos ater a quantidade, ou intensidade de uma resposta imune, mas também avaliarmos de maneira minuciosa a fonte, e a qualidade da mesma. Uma produção robusta de IFN- γ não necessariamente significa proteção de longa duração, pois a mesma pode ser proveniente de um número elevado de células CD4 simples positivas para esta citocina, que estão fadadas a morte rápida por apoptose, e não serão suficientes para proteger o indivíduo por muito tempo, ou de um número relativamente pequeno de células multifuncionais, extremamente eficientes na sua função efetora, e que permanecem no sistema por um período de tempo maior, devido à ação da IL-2.

6. CONCLUSÕES

- A magnitude de resposta imune, quando medida *in vitro* por citocinas avaliadas individualmente, não pareceu ser um bom parâmetro para o entendimento da resposta imune do tipo Th1 induzida após a infecção por *Leishmania*.

- O extrato total de *L. (V.) braziliensis* (LbT) foi o estímulo que induziu a maior proporção de células T CD4⁺ multifuncionais, coincidentemente o estímulo que contém antígenos de uma espécie do parasita homóloga aquela com a qual, possivelmente, a totalidade dos pacientes tenha sido infectada.
- O extrato total de *L. (L.) amazonensis* (PH8T) induziu a maior proporção de células T CD4⁺ simples produtoras de IFN- γ , que, segundo o modelo de diferenciação estudado, seriam células efetoras terminais que morreriam rapidamente.
- A qualidade de resposta imune da fração de membrana de *L. (L.) amazonensis* (PH8M), observada nos pacientes após o tratamento, indica a existência de antígenos de membrana capazes de induzir uma resposta do tipo Th1 com qualidade semelhante à induzida por LbT.
- Antígenos de espécies, ou de ao menos subgêneros diferentes de *Leishmania*, induzem uma qualidade de resposta imune do tipo Th1 distinta em pacientes com a forma cutânea de LTA.
- O aumento da proporção das células CD4⁺ multifuncionais observado nos pacientes curados da forma cutânea da doença sugerem um efeito benéfico dessas células na leishmaniose tegumentar americana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology.2003; 5th ed. Philadelphia: Elsevier Science.

Ahlers JD, Belyakov IM. Molecular pathways regulating CD4(+) T cell differentiation, anergy and memory with implications for vaccines. Trends Mol Med. 2010 Oct;16(10):478-91. Epub 2010 Aug 24.

Amaral VF, Ransatto VA, Conceição-Silva F, Molinaro E, Ferreira V, Coutinho SG, McMahon-Pratt D, Grimaldi G Jr. Leishmania amazonensis: the Asian rhesus macaques (*Macaca mulatta*) as an experimental model for study of cutaneous leishmaniasis. Exp Parasitol. 1996 Jan;82(1):34-44.

Amaral VF, Teva A, Oliveira-Neto MP, Silva AJ, Pereira MS, Cupolillo E, Porrozzi R et al. [Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed Leishmania\(*Leishmania*\) major vaccines in a rhesus monkey \(*Macaca mulatta*\) model of the human disease.](#) Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Oct;97(7):1041-8.

Amato VS; Andrade HF Jr; Duarte MIS. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. Acta Tropica; 2003, 85:39-49.

Anderson CF; Mendez S; Sacks DL. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *L. major* in C567Bl/6 mouse. Journal of Immunology; 2005, 174; 2934-41.

Anderson CF;Oukka M,Kuchroo V J, Sack D. CD4+CD25⁻Foxp3⁻ Th1 Cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. Journal of Experimental Medicine; 2006, Vol 4,No2,285-297.

Antunes CM, Mayrink W, Magalhaes PA, Costa CA, Melo MN, Dias M, et al. [Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis.](#) Int J Epidemiol. 1986;15(4):572-80.

Antoine JC, Prina E, Jouanne C, Bongrand P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acid pH; 1990 Infect Immun 58:779-87.

Antonelli LRV, 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 2004;136:341–8.

Antonelli L, Walderez O, Dutra b, Roque P, Almeida, Olivia Bacellar c, Edgar M, Carvalho c, Kenneth J. Gollob. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. 2005; Immunology Letters 10; 226–230; 2005.

Armijos RX, Weigel MM, Romero L, Garcia V, Salazar J. [Field trial of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: how long does protection last?](#) J Infect Dis. 2003;187:1959-61.

Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Hidalgo A, Cevallos W, Correa J. [Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis.](#) Vaccine; 2004; 22:1320-6.

Azeredo-Coutinho, R B. G. et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2007; 101; 735-737.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. Infection Immunity. 2002;70(12):6734-40.

Barr, T. A., Carling, J. & Heath, A. W. Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants. Vaccine ;2006;24, 3399–3407.

Barral A, Barral-Netto M, Almeida R, de Jesus AR, Grimaldi Júnior G, Netto EM, Santos I, Bacellar O, Carvalho EM. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infectious. Am J Trop Med Hyg; 1992; 47:587-92.

Betts, M. R. et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8 T cells. Blood; 2006; 107: 4781–478.

Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J. Exp. Med.; 2001; 194; 194(10):1497-1506.

Bhowmick S, Ali N. Recent developments in leishmaniasis vaccine delivery systems. Expert Opin Drug Deliv 2008; 5:789-803.

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

Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. Nature. 2006;440: 808–12.

Bogdan C; Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanism of parasite control and evasion. International Journal of Parasitol; 1998,28,121-134.

Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. Experimental Parasitology;1996 84: 188-194.

Bourreau E, Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D et al, Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due *Leishmania guyanensis*. Infection Immunity, 2009;77:1465-74

Bour-Jordan H, Bluesone JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. Journal of Clinical Immunology 2002;22(1):1-7.

Bretscher, P. A., Wei, G., Menon, J. N. & Bielefeldt-Ohmann, H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes 'susceptible' mice resistant to *Leishmania major*;1992 Science257, 539–542.

Caccamo N, Guggino G, Joosten SA, Gelsomino G, Di Carlo P, Titone L et al., Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection. Eur J Immunol. 2010 Aug;40(8):2211-20.

Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez 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. Clinical and Experimental Immunology;1993; 91: 500-505.

Campos-Neto. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? Brazilian Journal of Medical and Biobical Research;2005,38:979-984.

- Cardoso SR, da Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, Melo MN, Michalick MS, et al. [Identification and purification of immunogenic proteins from nonliving promastigote polyvalent Leishmania vaccine \(Leishvacin\)](#). Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(2):193-9.
- Carrier M, Liew FY, Parkinson C, Millot S, Severn A. Tumor necrosis factor in Leishmaniasis. Immunology. 1990;570-573.
- Carvalho, E.M, Barral A, Costa JM, Bittencour A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta Trop ;1994,56: 315-25.
- Chang, J. T., Palanivel, V. R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A. M., Banerjee, A., Longworth, S. A. et al., Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. Science 2007. 315:1687–1691.
- Chatelain, R., Varkila, K. & Coffman, R. L. IL-4 induces a TH2 response in Leishmania major-infected mice. J. Immunol.;1992;148, 1182–1187.
- Chatelain R., Mauze S ;Coffman RL. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. Parasite Immunol. 1999 Abr;21(4):211-218.
- Clark, R. A. et al. The vast majority of CLA+ cells are resident in normal skin. J. Immunology, 2006, 176:4431-9.
- Colotti G, Ilari A. Polyamine metabolism in Leishmania: from arginine to trypanothione. Amino Acids. 2011 Feb;40(2):269-85. Epub 2010 May 29.
- Convit J, Ulrich M, Zerpa O, et al. Immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-1999. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003; 97: 469-72.
- Convit J, Ulrich M, Polegre MA, et al. Therapy of Venezuelan patients with severe or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized Leishmania promastigotes and bacillus Calmette-Guerin – preliminary report. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99: 57-62.
- Coutinho SG, Oliveira MP, DA-Cruz AM, De Luca P, Mendonça S C F, Bertho A, Soong L, Mc-Mahon-Pratt D. T-Cell Responsiveness of American Cutaneous Leishmaniasis Patients to purified Leishmania pifanoi Amastigote Antigens and Leishmania braziliensis Promastigote Antigens: Immunologic Patterns Associated with cure;1996. Experimental parasitology, 84, 144-155.

- Creticos, P. S. Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, Li H et al. Immunotherapy with a ragweed-Toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N. Engl. J. Med.* 355, 1445–1455 (2006).
- Cuba CA, Miles MA, Vexenat A, Barker DC, McMahon Pratt D, Butcher J, Barreto AC, Marsden PD. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory diagnosis. *Rev. Soc. Bras. Med Trop.* 17:161-7;1984.
- Cunha-e-Silva NL, Hassón-Voloch A, De Souza W 1989. Isolation and characterization of a highly purified flagellar membrane fraction from trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 37: 129-136.
- Da Costa, Simone M et al. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brasil-Mini-review . *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol 102 (2): 149-153, March 2007.
- Da-Cruz AM, Filgueiras DV, Coutinho Z, Mayrink W, Grimaldi G Jr, De Luca PM, et al. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell responses and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94:537-42.
- Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In :Coura JR. *Dinâmica das doenças infecciosas ;1ª edição ; Rio de Janeiro :Guanabara Koogan,2005.Pags 697-712.*
- Darrah PA, Patel PD, De Luca PM, Lindsay RWB, Davey DF, Flynn BJ, Hoff ST, Andersen P, Reed SG, Morris SL, Roederer M & Seder RA, 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine mediated protection against *Leishmania major*. *Nature Medicine*, 13: 843-50.
- De Leonardis, F., Govoni, M., Lo Monaco, A., Trotta, F., 2009. Visceral leishmaniasis and anti-TNF- α therapy: case report and review of the literature. *Clin. Exp. Rheumatol.* 27, 503–506.
- De Luca PM, Mayrink W, Alves CR, Coutinho SG, Oliveira MP, Bertho AL et al. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine* 17 (1999) 1179-1185.

- De Luca PM, Mayrink W, Pinto JA, Coutinho SG, Santiago MA, Toledo VP, et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Acta Tropica* 2001;80(3):251–60.
- de Oliveira CI, Nascimento IP, Barral A, Soto M, Barral-Netto M. de Oliveira CI, Nascimento IP, Barral A, Soto M, Barral-Netto M. *Parasitol Int.* 2009 Dec;58(4):319-24. Epub 2009 Aug 19.
- Derrick SC, Yabe IM, Yang A, Morris SL. Vaccine-induced anti-tuberculosis protective immunity in mice correlates with the magnitude and quality of multifunctional CD4 T cells. *Vaccine*. 2011 Feb 21.
- de Souza W, Morgado-Diaz JA, Cunha-e-Silva NL. Cell fractionation of parasitic protozoa. *Methods Mol Biol.* 2008;425:313-31.
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* ; 2001; 95, 239-243
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immun. Microbiol. Dis* 27, 2004, 27 305-318.
- Drachenberg K J, Wheeler A. W., Stuebner, P. & Horak, F. A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy*;2001 56, 498–505.
- Dwyer DM. 1980. Isolation and partial characterization of surface membranes from *Leishmania donovani* promastigotes. *J Protozool* 27: 176-182.
- Elias D, Akuffo H & Britton S, 2005. PPD induced in vitro interferon-gamma production is not a reliable correlate of protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99: 363–368.
- Ebrahim, G. J. Leishmaniasis, *Journal of Tropical Pediatrics*;Junho 2000, Vol 46.
- Erdman LK, Dhabangi A, Musoke C, Conroy AL, Hawkes M, Higgins S et al. Combinations of Host Biomarkers Predict Mortality among Ugandan Children with Severe Malaria: A Retrospective Case-Control Study. *PLoS One*. 2011 Feb 25;6(2):e17440.
- Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh M.

- Memory T cells and vaccines. *Vaccine*. 2003 Jan 17;21(5-6):419-30.
- Fagundes, A et al. First encounter of subclinical human *Leishmania* (*Viannia*) infection in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 102(8): 1003-1005, December 2007.
- Faria, D 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*, Dec. 2005, p. 7853–7859 Vol. 73, No. 12.
- Fernandes AP, Herrera EC, Mayrink W, Gazzinelli RT, Liu WY, de Costa CA, et al. [Immune responses induced by a *Leishmania* \(*Leishmania*\) *amazonensis* recombinant antigen in mice and lymphocytes from vaccinated subjects](#). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997; 39(2): 71-8.
- FIOCRUZ; Fundação Oswaldo Cruz. Riode janeiro [online] [capturado no dia 6/02/2011].. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=354&sid=6> .
- Flynn JL, Einarsdottir T, Lockhart E Cytotoxicity and secretion of gamma interferon are carried out by distinct CD8 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*. 2009 Oct;77(10):4621-30. Epub 2009 Aug 10.
- Follador, I et al. Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical Form of *Leishmania braziliensis* Infection. *CID*:34 ,1 June, 2002.
- Forbes et al. 2008 Multifunctional, High Level Cytokine-Producing Th1 Cells in the Lung, but Not Spleen, Correlate with Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Aerosol Challenge in Mice. *J Immunol* 2008; 181; 4955-4964.
- Fouds K, Wu Chanf, Seder R. TH1 memory: implications for vaccine development. *Immunological Reviews*; 2006; Vol 211:58-66.
- FortDodge Saúde Animal [online]. São Paulo; Brasil... [capturado no dia 28 mar 2011]. Disponível em: http://www.fortdodge.com.br/divisoas/pets/pets_exibicao_bula.php?Produto=79&TipoProduto=12
- Franklin, G., Greenspan, J., Chen, S., 2009. Anti-tumor necrosis factor- α therapy provokes latent leishmaniasis in a patient with rheumatoid arthritis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 39, 192–195.

Gavron D, Saul A. Pioneer of tropical medicine. Rehovot, Israel: Balaban Publishers; 1997, ISBN 0-86689-045-9.

Gaze et al. Immunoregulation in Mucosal Leishmaniasis. *Scandinavian Journal of Immunology* 63, 70–78, 2005

Gibbs RA, Rogers J, Katze MG, Bumgarner R, Weinstock GM, Mardis ER et al. Rhesus macaque genome sequencing and analysis consortium. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science* 316: 222-234.; 2007.

Gicheru MM, Olobo JO, Anjili CO, Orago AS, Modabber F & Scott P, 2001. Vervet monkeys vaccinated with killed *Leishmania major* parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection. *Infect. Immun.* 69: 245–251.

Gollob KJ, Antonelli LR, Faria DR, Keesen TS, Dutra WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: A balancing act between protection and pathology. *International Immunopharmacology*, 2008.

Gomes-Silva A, Bittar RC, Nogueira RS, Amato VS, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clinical and Experimental Immunology* 2007; 149:440-444.

Gontijo, B; Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar americana. *Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 36(1): 71- 80, jan-fev, 2003.

Grimaldi Jr G. The utility of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and other non-human primate models for preclinical testing of *Leishmania* candidate vaccines. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Nov;103(7):629-44.

Grimaldi, G; Tesh RB & Mc Mahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41: 687-725.

Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 2001;14:205–215.

Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Jul;5(7):505-17.

Handman, Emanuela; Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clinical Microbiology Reviews.* 2001, p. 229–243. 53

Handman, E; Bullen, Denise V.E. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage, *Trends in Parasitology* Vol.18 No.8 August 2002.

Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood.* 2004 Feb 1;103(3):966-72. Epub 2003 Sep 4.

Harms, G. et al. Localized lymphadenopathy due to Leishmanial infection. *Infection*, 29, 2001.

Herath S, Kropf P, Müller I. Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. *Parasite Immunol.* 2003 Nov-Dec;25(11-12):559-67.

HertapeCalier[online]. Juatuba, Minas Gerais. [capturado 28 mar 2011]. Disponível em:
http://www.hertapecalier.com.br/site/empresa/?tp=32&site=1&secao=2&produto_id=64 :

Herrwalt, B. Leishmaniasis. *The Lancet* Vol 354, 1191-1199, October 2, 1999.

Huaman MC, Mullen GED, Long CA, Mahanty S, 2009. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 vaccine elicits multifunctional CD4 cytokine-producing and memory T cells. *Vaccine* 27: 5239–5246.

Huber M et al. Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect Immunology*, 1987;17:1429-1433.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5: 987–95.

Jordan MB, Mills DM, Kappler J, Marrack P, Cambier JC. Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. *Science*; 2004;304(5678):1808-10.

Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity.* 2007 Sep;27(3):393-405.

- Kamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Ind J med Res* 2006;123:423—38.
- Kamgang RK, Ramos I, Rodrigues Duarte L, Ghielmetti M, Freudenberg M, Dahinden C, et al. Using distinct molecular signatures of human monocytes and dendritic cells to predict adjuvant activity and pyrogenicity of TLR agonists. *Med Microbiol Immunol* 2008;197(Dec (4)):369–79.
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E. & Sacks, D; Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290,2000; 1351–1354.
- Kannanganat S., Ibegbu, C, Chennareddi L, Robinson H L 7 Amara, R.R. Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *J Virol*;2007,81,8468-8476.
- Kane M. & Mosser D M. 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J. Immunol.* 166:1141–1147.
- Kedzierski L, [Zhu Y](#), [Handman E](#). Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology.* 2006;133(Suppl):S87-S112.
- Killick-Kendrick, R.. Biology of Leishmania in Phlebotomine sandflies, In *Biology of the Kinetoplastida*, ed. WHR Lumsden, DA Evans. London Academic. 1979, pp. 395–460.
- Kima, P E. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist, *International Journal for Parasitology*;2007, 37,1087-1096.
- Kopf, M. et al. IL-4-deficient BALB/c mice resist infection with Leishmania major. *J. Exp. Med*;1996;184, 1127–1136.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchro V. Th17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol*;2009;27;485-517.
- Lahiri A, Das P, Chakravorty D. [Engagement of TLR signaling as adjuvant: towards smarter vaccine and beyond](#). *Vaccine.* 2008;26:6777-83.
- Lainson R, Bray RS. Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. II. Cross-immunity experiments among different forms of American cutaneous leishmaniasis in monkeys. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1966;60(4):526-32

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis* and *L. b. panamensis*. . **J Trop Med Hyg.** 1977 Feb; 80(2):29-35.

Lainson, R.. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc TropMed Hyg*; 1983 77: 569–596.

Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In WPeters, R Killick-Kendrick (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1, Academic Press, London, p. 1-120.

Lerner, EA; Ribeiro, J M. C. ; Nelson, Robert J. ; Lerne, Michael R.. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J. Biol Chem*;1991, 266:11234-6.

Lindenstrøm T, Agger EM, Korsholm KS, Darrah PA, Aagaard C, Seder RA, Rosenkrands I, Andersen P. 2009. Tuberculosis Subunit Vaccination Provides Long-Term Protective Immunity Characterized by Multifunctional CD4 Memory T Cells. *J. Immunol.* 182:8047-8055 .

Lopez K,Dinges S,Griewank,Iwakura Y,Udley MC,von Stebut E.IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice.*J immunol* 2009;182:3039-46.

Machado-Pinto J, Pinto J, da Costa CA, Genaro O, Marques MJ, Modabber F, et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. *Int J Dermatol.* 2002;41:73-8.

Maioli T, Takane E,Arantes RM,Fietto J,Afonso LC. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res*;2004;94: 207–212.

Marques da Cunha A. Infecções experimentais na leishmaniose tegumentar americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1944;41:263-82.

Marzochi, MC. As Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses Tegumentares. *Journal Brasileiro de Medicina*;1992, 63: 82-104.

Marzo A, Klonowski K, Le bon A, Borrow P, Tough D, Lefrançois L. Inicial T cell frequency dictates memory CD8 lineage commitment. *Nature Immunology*,2005;Vol 6 (8).

McMaho-Pratt, D.; Alexander, J.. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? Immunol. Rev;2004, 201, 206–224.

Mayrink W, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Lima AO, et al. [A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis.](#) Trans R Soc Trop Med Hyg. 1979;73(4):385-7.

Mayrink W, Williams P, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, et al. [An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil.](#) Ann Trop Med Parasitol. 1985;79(3):259-69.

Mayrink W, Magalhães PA, Michalick MSM, Costa CA, Lima AO, Melo MN, et al. Immunotherapy as treatment of American cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. Parasitologia 1992;34:159-65.

Mayrink W, Botelho AC, Magalhaes PA, Batista SM, Lima Ade O, Genaro O, et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39:14-21.

Medeiros Â C.; R, Ana Maria.. Leishmaniose Tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. An bras Dermatol.; jul/ago.1999.Rio de Janeiro, 74(4): 329-336.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 1997; 388: 394–97.

Mendonça SC, Coutinho SG, Amendoeira RR, Marzochi MC, Pirmez C. Human American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. Clinical and Experimental Immunology; 1986, 64: 269-276.

Mendonça SC, De Luca PM, Mayrink W, Restom TG, Conceicao-Silva F, Da-Cruz AM, et al. [Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis.](#) Am J Trop Med Hyg. 1995; 53(2):195-201.

Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. J Immunol; 2004 Mar 1;172(5):2731-2738.

Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature; 2006, 442, 39-44.

Ministério da saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana- 2ª Edição. Brasília 2007.

Modabber, F. Experiences with vaccines against cutaneous leishmaniasis: of men and mice. *Parasitology*;1989;98,S49-60.

Modabber F. Vaccines against leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.*;1995;Dec;89,Suppl 1:83-8.

Modabber, F et al. Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneousleishmaniasis.InstitutePasteur,Paris.13–15June,2006,KinetoplastidBiologyand Disease;2006;20076:3,1-24.

Moosser D M; Brittingham A. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* ;1997;115,S9-S23.

Mohrs, M. et al. Differences between IL-4- and IL-4 receptor α -deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J. Immunol.*1999; 162, 7302–7308.

Moreira W, Leblanc E, Ouellette M. The role of reduced pterins in resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates in the protozoan parasite *Leishmania*. *Free Radical Biology & Medicine*; 2009; 46: 367–375.

Mota Sasaki MD, Matsumo Carvalho M, Schmitz Ferreira ML, Machado MP. Cutaneous Leishmaniasis Coinfection in AIDS Patients: Case Report and Literature Review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*;1997, 1: 142-144.

Nabors, G. S., Nolan, T., Croop, W., Li, J. & Farrell, J. P. The influence of the site of parasite inoculation on the development of TH1- and TH2-type immune responses in(BALB/c \times C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunol.* 17, 569–579 (1995).

Nadim A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni G, Ghorbani M. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1983;76(4):377-83.

Nascimento E, Mayrink W, da Costa CA, Michalick MS, Melo MN, Barros GC, et al. [Vaccination of humans against cutaneous leishmaniasis: cellular and humoral immune responses.](#) *Infect Immun.* 1990;58(7):2198-203.

Nikolich-Zugich J. Non-human primates models of T-cell reconstitution. *Semin Immunol* ; 2007;19: 310-317.

Nylén, S; Gaudam, S. Immunological perspectives of Leishmaniasis. *Journal of Global Infectious disease*;2010; Vol 2,issue 2.

Oliveira MR, Tafuri WL, Afonso LC, Oliveira MA, Nicoli JR, Vieira EC, Scott P, Melo MN & Vieira LQ. Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. *Parasitology*,2005;131: 477–488.

Okwor I, Uzzona J. Persistent parasites and immunological memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine design and vaccination studies. *Immunology Res*;2008,41:123-136.

Okwor I, Liu D, Uzonna J. Qualitative differences in the early immune response to live and killed *Leishmania major*: Implications for vaccination strategies against Leishmaniasis. *Vaccine*. 2009 Apr 28;27(19):2554-62. Epub 2009 Feb 10.

Parida SK, Kaufmann SH. The quest for biomarkers in tuberculosis. *Drug Discov Today*. 2010 Feb;15(3-4):148-57. Epub 2009 Oct 23.

Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):648-55

Pessoa SB, Pestana BR. Ensaio sobre vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germes mortos. *Arq Hig Saude Publ*; 1941; 6:141–7.

[Pirmez C, Yamamura M, Ujemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL.](#) Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation*;1993 91: 1390-1395.

Pinheiro RO, Pinto EF, Benedito AB, Lopes UG, Rossi-Bergmann B. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. *An Acad Bras Cienc*. 2004 Sep;76(3):519-27.

Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JR, Guedes HL, Fentanes RF, Rossi-Bergmann B. TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infect*. 2005 Oct;7(13):1317-23.

Porrozzi R, Teva A, Amaral VF, Santos da Costa MV, Grimaldi G Jr. Cross-immunity experiments between different species or strains of *Leishmania* in rhesus macaques (*Macaca Mulatta*). *AmJ Trop Med Hyg* ;2004,71: 297-305.

Porrozzi R, Pereira MS, Teva A, Volpini AC, Pinto MA, Marchevsky RS, Barbosa AA Jr, Grimaldi G Jr 2006. *Leishmania infantum* induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a primate model for visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*;2006 100: 926-937.

Rabelo E. Distribuição geográfica no Brasil da Leishmaniose. *Bol Soc Bras Dermatol* 1913; 2: 26–28.

Raman VS, Bhatia A, Picone A, Whittle J, Bailor HR, O'Donnell J, Pattabhi S, Guderian JA, Mohamath R, Duthie MS, Reed SG. Cutaneous Leishmaniasis Immunotherapy: Implications in Applying cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.*;2010,185;1701-1710.

Reed, S.G.; Scoot, P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr. Op. Immunol*,1993,5:524-31.

Reithinger, R; Davies, Clive R. Is the domestic dog (*CANIS FAMILIARIS*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*,1999 61(4), pp. 530–541

Reithinger, R. Antroponotic cutaneous leishmaniasis, Kabul, Afghanistan. *Emerging Infectious Diseases*;2003 June, Vol. 9, No 6.

Reithinger, R; Coleman, PG; Alexander, B; Vieira, EP; Assis, G; Davies, CR. Are insecticide impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int J Parasitol* 2004;34:55–62.

Requena JM, Iborra S, Carrión J, Alonso C, Soto M. Recent advances in vaccines for leishmaniasis. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 Sep;4(9):1505-17.

Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 143–48

Ritting MG; Bogdan C. *Leishmania–Host-cell Interaction: Complexities and Alternative Views*, *Parasitology Today*;2000, vol. 16, no. 7.

- Rocha P, Almeida R, Bacellar O, Jesus A,Correia Filho D,Barral A et al. Down regulation of TH1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Infectious Disease*, 1999;180:1731-1734.
- Rostami NS et al. CD8+ Tcells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis. *PLOS Neglected tropical diseases*, 2010; volume 4;issue 10,e845.
- Ruiz J H & Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*,2007;29,671-678.
- Russel, D G; Wright, Samuel D.,J. *Exp.. Med.*, The Rockefeller University Press,1988;Volume 168 July, 279-292
- Sacks, D. L., Hieny, S. & Sher, A. Identification of cell-surfacecarbohydrate and antigenic changes between non infectiveand infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J. Immunol.*1984; 135, 564–569.
- Sacks, D. ; Kamhawi, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. 55:453–83.
- Sacks, D.and Noben-Trauth,N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews*; 2002, volume 2F.
- Sacks,D et al. Nonhealing Infection despite Th1 Polarization Produced by a Strain of *Leishmania major* in C57BL/6 Mice. *The Journal of Immunology* ;2005;174:2934–2941.
- Sadick, M. D. et al. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin-4 monoclonal antibody. Evidence for a T-cell-dependent, interferon- γ -independent mechanism. *J. Exp.Med.*;1990;171: 115–127.
- Sales Gomes L. A intra-dermoreacao de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas affins. *Brasil Medico* 1939;(53):1079–87.
- Salman SM,Rubeinz NG,Kibbi AG. Cutaneous Leishmaniasis: Clinical features and diagnosis.*Clin Dermatol.*1999;17(3):291-6.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.*Nature.* 1999 Oct 14;401(6754):708-12.

- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:745-63.
- Saravia NG, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco R, Labrada LA, Goncalves A.. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection- reactivation or reinfection? *Lancet*;1990.18:398-402.
- Schijns, V. E. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Crit. Rev. Immunol.*;2001 21, 75–85.
- Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R. L., Pearce, E. & Sher, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T-cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T-helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.*,1988; 168, 1675–1684.
- Seder RA, Darrah PA, Roederer M.. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immuno*;2008 .8(4):247-58.
- Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nature R Immunology* 2002;2(2):116-126.
- Silveira FT, Mayrink W. Leishmaniose Cutânea difusa no Estado do Pará, Brasil: Registro do primeiro caso de cura da doença após associação de quimioterapia com imunoterapia. XXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1993;26(supl):229.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*;2004; 99: 239-251.
- Singh ,S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123,March 2006,pp 311-330.
- Souza-Lemos C, de-Campos SN, Teva A, Côrte-Real S, Fonseca EC, Porrozzi R, et al. Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. *J Pathol.* 2008 Nov;216(3):375-86.

Stebut, E et al. Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha/beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNFalpha. *Blood*;2003; 101, 210-215.

Sutherland JS, de Jong BC, Jeffries DJ, Adetifa IM, Ota MO. Production of TNF-alpha, IL-12(p40) and IL-17 can discriminate between active TB disease and latent infection in a West African cohort. *PLoS One*. 2010 Aug 24;5(8):e12365.

Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH .Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science*; 2002 . 11: 338-342.

Tanel A, Fonseca SG, Yassine-Diab B, Bordi R, Zeidan J, Shi Y, Benne C, Sékaly RP. Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival. *Expert Rev Vaccines*. 2009 Mar;8(3):299-312.

Telino E, De Luca PM, Matos DCS, Azeredo-Coutinho RB, Meirelles MN, Conceição-Silva F, et al. In vitro responses of human peripheral blood mononuclear cells to whole-cell, particulate and soluble extracts of *Leishmania* promastigotes. *Clin Exp Immunol*. 2006;143(2):338-44

Teodoro, U; Kuhl, JB; Santos, DR; Santos ES, Impact of environmental changes on sand fly ecology in southern Brazil. *Caderno de Saúde Pública* , 1999, 15:901-906.

Teva A, Porrozzi R, Cupolillo E, Pirmez C, Oliveira-Neto MP, Grimaldi G Jr. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*-induced chronic granulomatous cutaneous lesions affecting the nasal mucosa in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. *Parasitology*. 2003 Nov;127(Pt 5):437-47.

Tonui WK, Titus RG. Cross-protection against *Leishmania donovani* but not *L. braziliensis* caused by vaccination with *L. major* soluble promastigote exogenous antigens in BALB/c mice. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Mar;76(3):579-84.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. 2002 Dec 15 ;1 86 (12):1829-34.

Uchida T. Development of a cytotoxic T-lymphocyte-based, broadly protective influenza vaccine. *Microbiol Immunol.* 2011 Jan;55(1):19-27.

Unsoeld H, Krauwald S, Voehringer D, Kundendorf U, Pincher H. Cutting edge : CCR7+ and CCR7- memory cells do not differ in immediate effector cell function. *J Immunol.*;2002;169:638-641.

Vanloubbeeck Y, Jones DE. The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. *Ann N Y Acad Sci*;2004 Oct;1026:267-72.

Vélez ID, del Pilar Agudelo S, Arbelaez MP, Gilchrist K, Robledo SM, Puerta JA, et al. [Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania \(L.\) amazonensis* vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial.](#) *Trans R Soc Trop Med Hyg* ;2000;94:698-703.

Vélez ID, Gilchrist K, Arbelaez MP, Rojas CA, Puerta JA, Antunes CM, Zicker F, Modabber F. [Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia.](#) *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;99:593-8.

Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJ, Oliveira MP, Rutowitsch MS, Da-Cruz AM. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermatol*;2008 Sep;47(9):926-32.

Vincendau P, Gobert AP, Daulouède S, Moynet D, Mossalayi MD. Arginases in parasitic diseases. *Trends in Parasitology*; 2003, 19(1): 9-12.

Watchmaker PB, Urban JA, Berk E, Nakamura Y, Mailliard RB, Watkins SC et al. Memory CD8+ T cells protect dendritic cells from CTL killing. *J Immunol.* 2008 Mar 15;180(6):3857-65.

Wherry E, Teichgräber V, Becker T C, Masopust D, Kaech S, Antia R et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature Immunol*;2003 4, 225–234.

WHO(acesoem10/01/11);<http://www.who.int/leishmaniasis/en/who>; *Weekly Epidemiological Record. Relevé Épidémiologique Hebdomadaire*;2002;No.44,77,365-72.

Wu CY, Kirman JR, Rotte MJ, Davey DF, Perfetto SP, Rhee EG, Freidag BL, Hill BJ, Douek DC, Seder RA. Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. Nat Immunol. 2002 Sep;3(9):852-8.

Younes, S.A. et al. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2- producing HIV-specific memory CD4+ cells endowed with proliferative capacity. J Exp Med;2003,198;1909-1922.

Zaragoza B, Evaristo C, Kissenpennig A, Libri V, Malissen B, Rocha B, Freitas, AA, Almeida AR. Cell-to-Cell Interactions and Signals Involved in the Reconstitution of Peripheral CD8 T(CM) and T(EM) Cell Pools. PLoS One. 2011 Mar 14;6(3):e17423

8. ANEXOS

8.1. Anexo I - Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
--

Instituição: INSTITUTO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

Título do Projeto: Desenvolvimento de vacinas candidatas contra leishmaniose a partir de genes de *Leishmania amazonensis*

Pesquisador: Dr. Sergio CF Mendonça

Nome do Voluntário: _____

Como voluntário, o (a) Sr. (a) está sendo solicitado (a) a participar de uma investigação científica, patrocinada pela Fundação Oswaldo Cruz com o objetivo de investigar a resposta

imunológica induzida por antígenos candidatos a vacina contra leishmaniose, sob a Coordenação do Dr. Sergio C. F. Mendonça, Médico Infectologista e Pesquisador Titular do Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz. Este documento procura fornecer ao (a) Sr. (a) informações sobre o problema de saúde em estudo e o que será realizado, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais. O (A) Sr. (Sra.) poderá recusar-se a participar da pesquisa ou, mesmo, dela se afastar em qualquer tempo, sem que este fato lhe venha a causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte da instituição, a qual manterá o acompanhamento e tratamento que lhe está sendo prestado para atender o problema de saúde objeto da investigação. Os investigadores se obrigam a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, assim como, poderão interromper a participação do Sr. (a), a qualquer tempo, por razões técnico/médicas quando, então, lhe serão fornecidos aconselhamentos e orientação. Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. O Sr. (a) receberá todos os cuidados médicos adequados para o controle de efeitos adversos que possam ocorrer, em consequência de sua participação nesta pesquisa. Os dados obtidos não serão utilizados para fins que não constem nos objetivos deste projeto. Antes de assinar este Termo, o Sr. (a) deve informar-se plenamente sobre o mesmo, não hesitando em formular perguntas sobre qualquer aspecto que julgar conveniente esclarecer. É importante estar ciente das seguintes informações:

1- O problema de saúde objeto da investigação:

A leishmaniose tegumentar é uma doença da pele de gravidade variável de acordo com a reação do organismo do doente. É causada por um protozoário denominado *Leishmania*. A melhor forma de se evitar a leishmaniose tegumentar seria através de uma vacina.

2- Objetivo da investigação:

Pesquisas deste tipo representam um passo necessário para o desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose tegumentar. Em todo o mundo milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença, inclusive no continente americano. O objetivo principal desta pesquisa é avaliar a resposta de células de defesa contra as vacinas testadas, a fim de se verificar se esta resposta está ou não relacionada com uma possível proteção contra a doença.

3- Exames, procedimentos e agentes terapêuticos que serão utilizados:

Nesta investigação está prevista apenas a coleta de sangue venoso periférico. Se o Sr. (a) é portador de leishmaniose ou está tendo atendimento médico confirmar ou não o diagnóstico desta doença, a coleta de amostras de sangue faz parte da rotina para diagnóstico e acompanhamento clínico nos ambulatórios especializados. Os testes diagnósticos envolvem em geral amostras um pouco menores (5 ml). A concordância em participar na pesquisa implicará na coleta de um volume superior(20 ml), mas que também não trará nenhum risco adicional nem envolverá nenhuma mudança no procedimento técnico de coleta. Todo o material usado na coleta é descartável e será utilizado apenas uma vez em cada voluntário.

4- Benefícios:

A conclusão deste estudo poderá representar um avanço importante para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose tegumentar e, conseqüentemente, um benefício para as populações de áreas onde ocorre a transmissão da doença.

5- Inconvenientes:

Os inconvenientes são apenas os relacionados à coleta de amostras de sangue venoso periférico.

6- Riscos potenciais conhecidos até os dias atuais:

Não existem riscos potenciais conhecidos, visto que os procedimentos que serão utilizados durante este estudo são rotineiramente usados para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

7- Garantia de confidencialidade:

Os dados coletados ficarão sob responsabilidade do coordenador do projeto que se responsabilizará pela confidencialidade dos mesmos. Em nenhuma hipótese a identidade dos participantes será revelada. Toda precaução será tomada no sentido de preservar o direito de privacidade dos participantes.

O Pesquisador responsável (Dr. Sergio Coutinho Furtado de Mendonça) estará à sua disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre este projeto, no telefone: 3865-8198. Declaro estar ciente do inteiro teor deste Termo de Consentimento, decidindo-me a participar da investigação proposta, depois de ter formulado perguntas e de ter recebido respostas satisfatórias a todas elas, e ciente de que poderei voltar a fazê-las a qualquer tempo, assim como abandonar o estudo a qualquer momento caso queira, e que a decisão de abandonar o estudo não terá qualquer influência no atendimento médico nem na relação médico-paciente.

Declaro dar meu consentimento para participar desta investigação recebendo uma cópia do Termo, estando ciente, ainda, de que outra cópia permanecerá registrada nos arquivos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Local e data: _____

Nome do voluntário: _____

Endereço do voluntário: _____

Assinatura do voluntário: _____

Local e data: _____

Assinatura do investigador: _____

Local e data: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Local e data: _____

8.2 Resultados preliminares

Metodologia Kit CBA

Um total de 1×10^6 CMSP obtidas de pacientes e controles sadios foram independentemente estimuladas em placas de 24 poços (Nunc, EUA) com os extratos totais (PH8T e LbT) e frações antigênicas de *L. (L.) amazonensis* (10µg/mL) e cultivadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (NAPCO, NY, EUA). Os sobrenadantes de culturas foram coletados após 72 horas para dosagem de citocinas (IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL10, IL4, IL5) utilizando-se o kit comercial CBA (BD, EUA).

Análise quantitativa da produção de citocinas nos sobrenadantes de culturas estimuladas com os antígenos totais LbT e PH8T e com as frações antigênicas de *L. (L.) amazonensis*.

Podemos notar que as células dos pacientes (AT e PT) produziram mais IFN-γ do que as células dos indivíduos do grupo controle, quando estimuladas com os extratos totais LbT e PH8T e com as frações de *L. (L.) amazonensis*, porém, devido ao número pequeno de amostras testadas no grupo controle (apenas duas), não foi possível a realização de teste estatístico (**Figura 8.1**).

No grupo de pacientes antes do tratamento obtivemos resultados mais heterogêneos em relação ao grupo pós-tratamento, com valores mínimos e máximos bem discrepantes.

Com relação a produção de TNF-α (**Figura 8.2**) percebe-se que o estímulo com o extrato total de *L. (V.) braziliensis* (LbT) foi o que induziu a maior concentração desta citocina nos grupos de pacientes, porém não obtivemos nenhuma diferença de significância estatística.

Na avaliação da produção de IL-2 existe uma tendência da fração solúvel (PH8S) induzir a produção de níveis muito baixos desta citocina mas, novamente não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os estímulos nem entre os grupos AT, PT e controle (**Figura 8.3**). O mesmo pode ser observado com relação a IL-10 (**Figura 8.4**).

Com relação à produção de IL-5 foram detectados níveis baixos ou ausentes da citocina nos grupos de pacientes e no grupo controle, porém, os níveis mais elevados foram observados nos pacientes antes do tratamento (**Figura 8.5**). Novamente, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

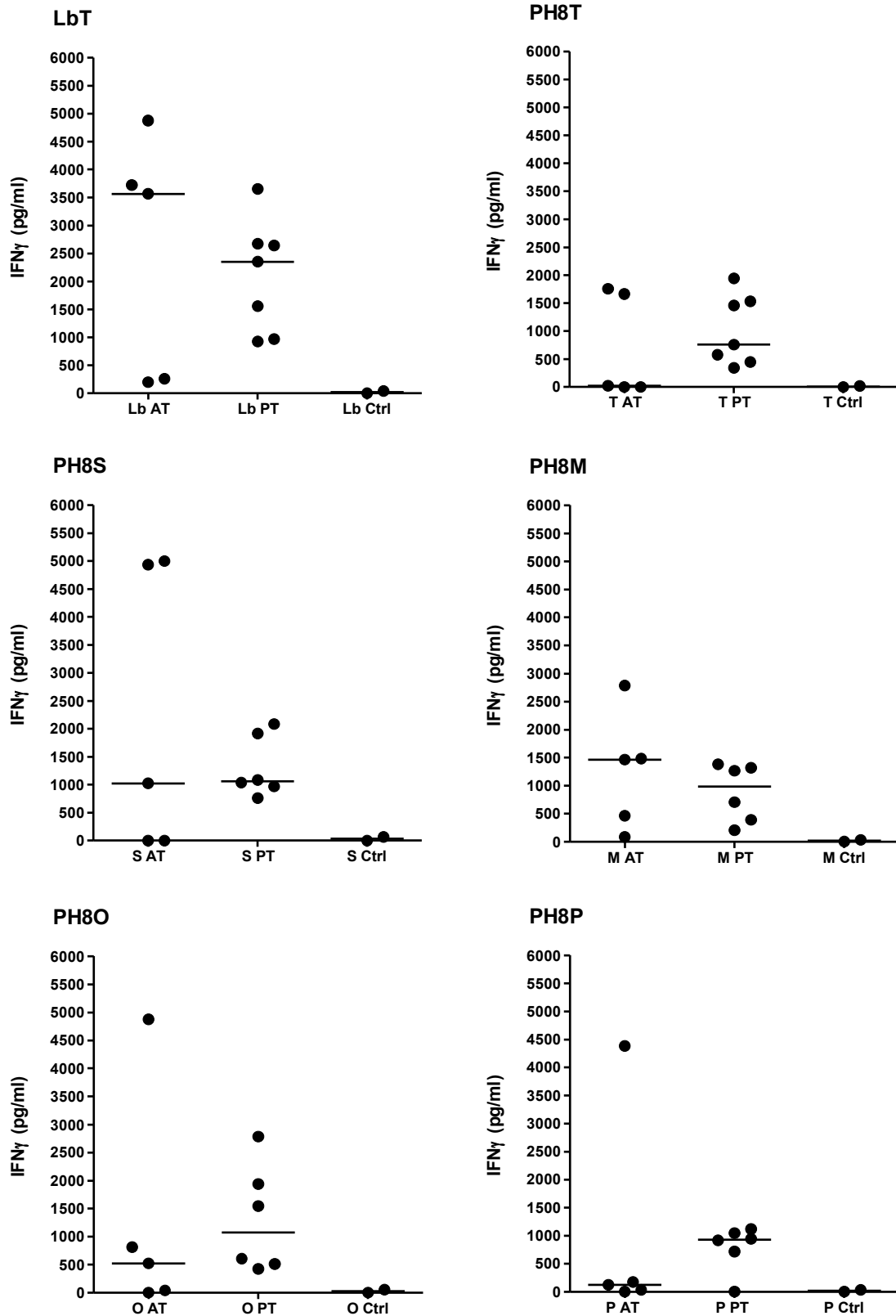


Figura 8.1: Níveis de IFN γ (pg/ml) detectados nas culturas de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com os antígenos totais LbT e PH8T e as diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl), utilizando-se o kit CBA. As linhas horizontais indicam os valores da mediana de cada grupo.

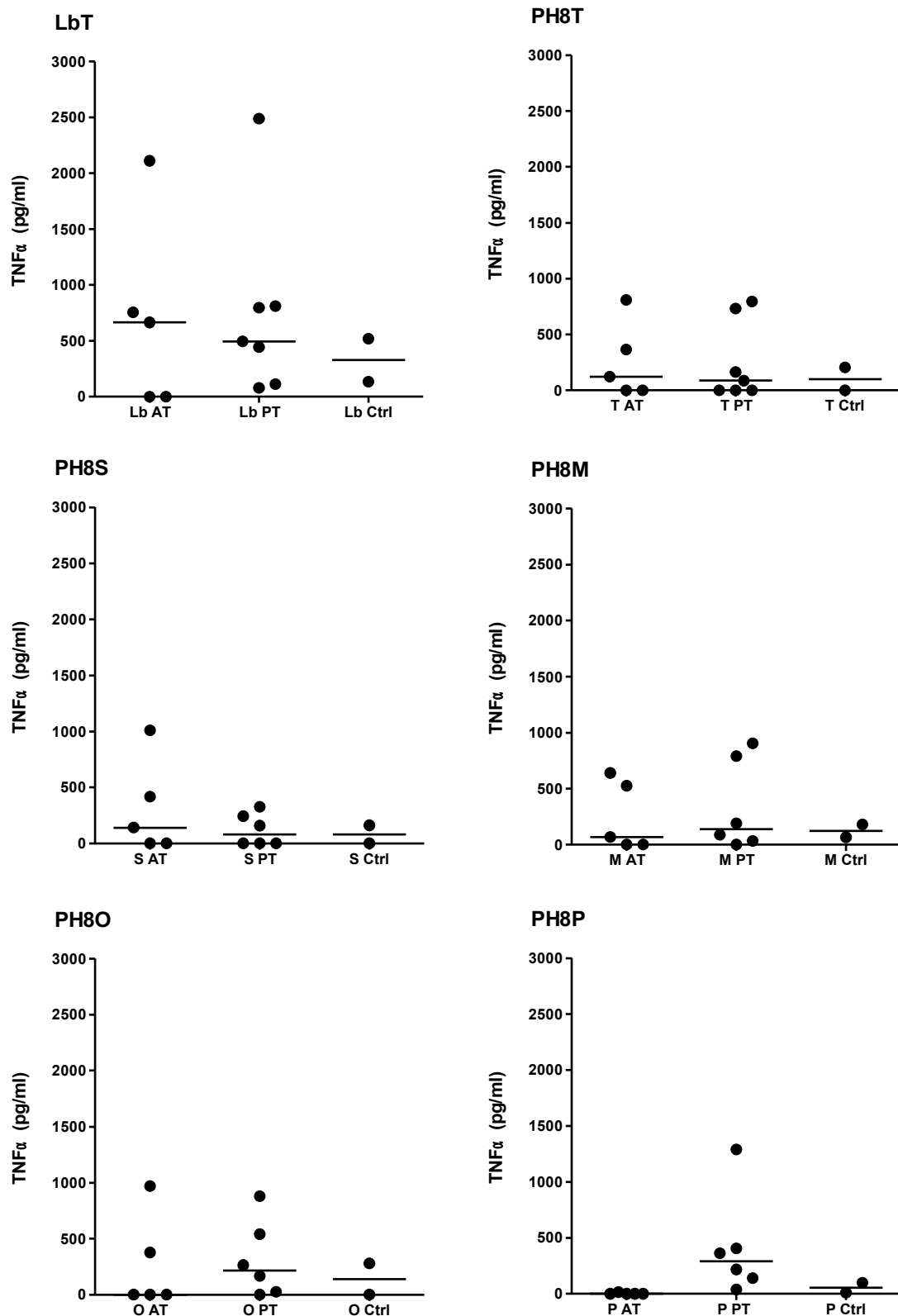


Figura 8.2: Níveis de TNF α (pg/ml) detectados nas culturas de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com os antígenos totais LbT e PH8T e as diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl), utilizando-se o kit CBA. As linhas horizontais indicam os valores da mediana de cada grupo.

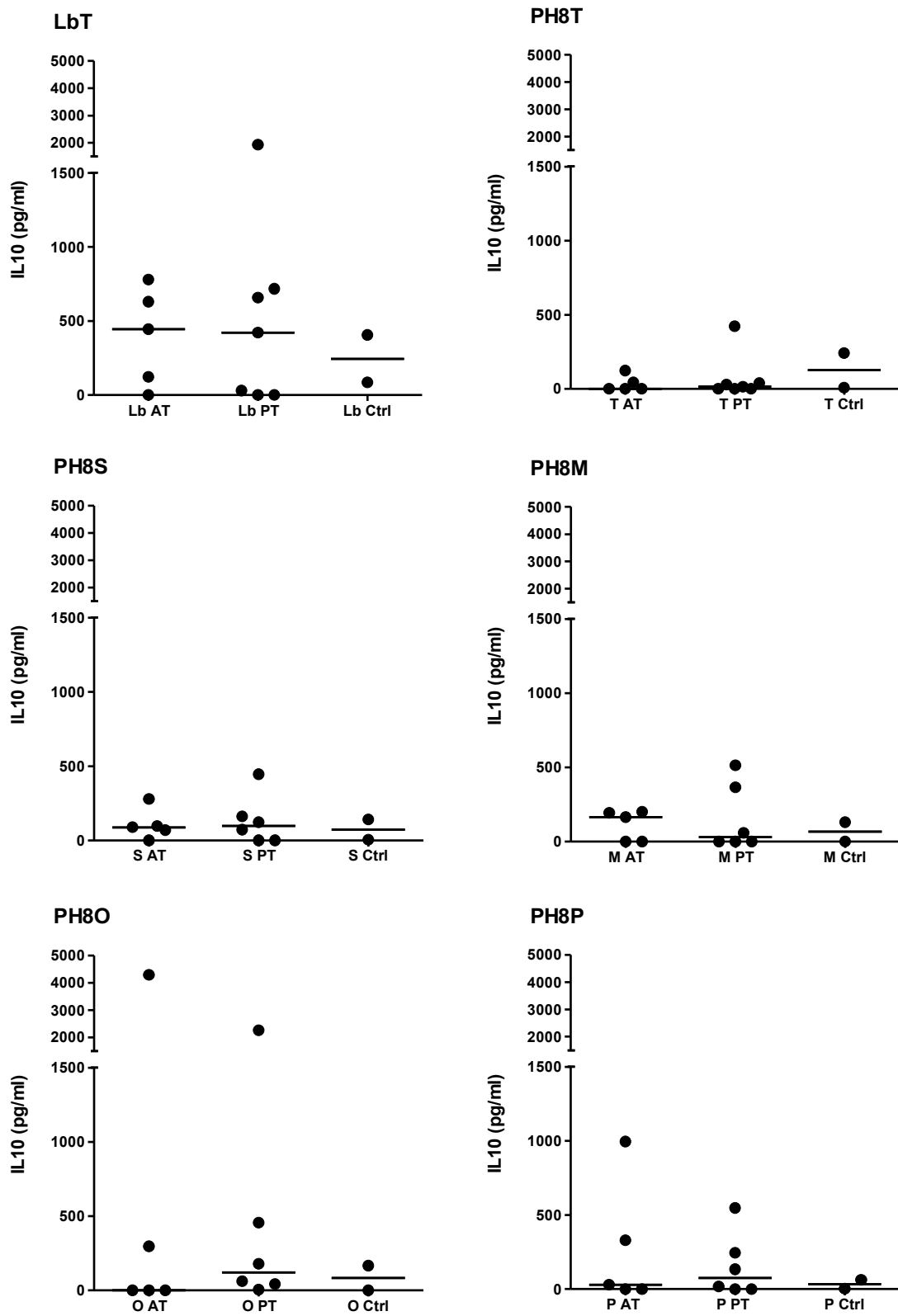


Figura 8.4: Níveis de IL10 (pg/ml) detectados nas culturas de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com os antígenos totais LbT e PH8T e as diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl), utilizando-se o kit CBA. As linhas horizontais indicam os valores da mediana de cada grupo.

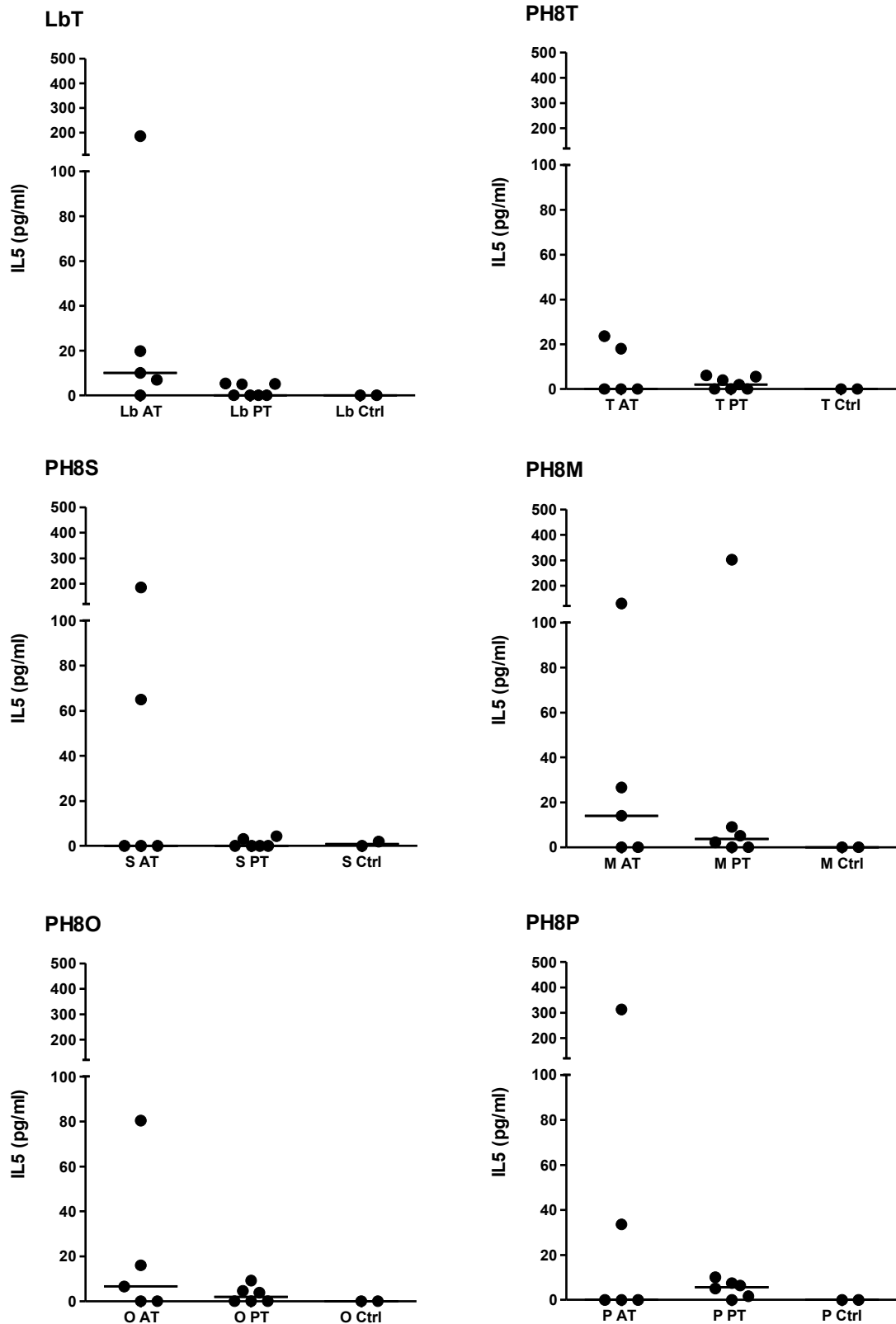


Figura 8.5: Níveis de IL5 (pg/ml) detectados nas culturas de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com os antígenos totais LbT e PH8T e as diferentes frações de *L. (L.) amazonensis* (PH8S, PH8M, PH8O e PH8P) nos grupos de pacientes antes (AT) e após o tratamento (PT) e no grupo controle (Ctrl), utilizando-se o kit CBA. As linhas horizontais indicam os valores da mediana de cada grupo.

Como perspectiva, aumentaremos a casuística de pacientes para evidenciar diferenças entre os grupos, como encontrada pela técnica de ELISA para IFN- γ .