



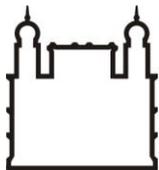
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Avaliação da expressão gênica de *TBET* e *GATA3* por células T
reativas a *Leishmania braziliensis* em indivíduos curados
cl clinicamente da leishmaniose cutânea

por

Giselle Aparecida Fagundes Silva

Rio de Janeiro – Brasil
Março de 2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

GISELLE APARECIDA FAGUNDES SILVA

Avaliação da expressão gênica de *TBET* e *GATA3* por células T reativas a *Leishmania braziliensis* em indivíduos curados clinicamente da leishmaniose cutânea

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do grau de Mestre, área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dr. Alda Maria Da-Cruz

Rio de Janeiro
2010

S586

Silva, Giselle Aparecida Fagundes.

Avaliação da expressão gênica de *TBET* e *GATA3* por células T reativas a *Leishmania braziliensis* em indivíduos curados clinicamente da leishmaniose cutânea / Giselle Aparecida Fagundes Silva. – Rio de Janeiro, 2010.

xvi, 92 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2010.

Bibliografia: f. 79-92

1. Leishmaniose tegumentar americana. 2. Resposta imune celular. 3. Fatores transcricionais e citocinas. 4. Tempo de cura. 5. Manutenção da cura clínica. I. Título.

CDD 616 9364

GISELLE APARECIDA FAGUNDES SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *TBET* E *GATA3*
POR CÉLULAS T REATIVAS A *Leishmania braziliensis* EM
INDIVÍDUOS CURADOS CLINICAMENTE DA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Banca examinadora:

Dr. Renato Porrozzini

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Dr. Silvio Favoreto Junior

Northwestern University – Chicago, IL

Dr. Ulisses Gazos Lopes

Instituto de Biofísica – UFRJ

Suplentes:

Dr. Silvia Amaral

Departamento de Parasitologia – UERJ

Suplente e revisora

Dr. Luzia Pinto

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da minha vida. Por ter permitido com que eu nascesse nesta família tão especial e ter feito com que ao longo da vida, eu encontrasse pessoas maravilhosas que hoje considero como meus amigos. Obrigado Senhor, por ter me dado esta oportunidade de crescer e amadurecer profissionalmente, e também por me dar a certeza que estará sempre comigo.

Aos meus pais, Cleuza e João, primeiramente por ter me dado a oportunidade de vir a esse mundo. Pelo apoio emocional, financeiro e espiritual. Pelas palavras de carinho e também pelas broncas e repreensões que ainda hoje são importantes para a formação do meu caráter. Obrigado pela confiança, por acreditarem que sou capaz, mesmo quando me acho tão impossibilitada de resolver as situações. A vocês, todo meu amor e dedicação.

A minha família, mesmo estando um pouco distante, e não entendendo muito o que eu faço, sempre me apoiaram e me deram forças para continuar nesta caminhada.

À Dr. Alda, a pessoa que me acolheu não apenas como aluna, mas como mãe (as semelhanças estão aí para comprovar isso). Agradeço-lhe pela amizade, pela dedicação, pela confiança e pelo carinho.

À Dr. Luzia Pinto, por ter aceitado ser minha revisora mesmo com prazo curto para entrega da dissertação. Por ter sido tão gentil e paciente comigo.

Ao doutorando Adriano Gomes da Silva, que vem acompanhando minha caminhada desde a iniciação científica, e que hoje é considerado praticamente meu co-orientador. Obrigado pela dedicação, pela paciência, por ter me acalmado nos momentos de desespero, e também ter me desesperado nos momentos de calma (rs). Pelas vezes que senti raiva por você ser tão exigente comigo. Por ter sido muito mais que um colega de trabalho, mas um amigo, ou até mesmo um irmão.

A Regina Carvalho, mais conhecida como Regininha. Pela sua amizade fortificada através do Mestrado. Agradeço também por compartilharmos alegrias, angústias, frustrações, medo e etc. Por todos os momentos maravilhosos que passamos juntas.

A mestrandia Claudia Covas, por me ensinar tantas vezes genética. Obrigado por me contagiar com a sua alegria, principalmente naqueles momentos em que eu mais precisava. E claro obrigado pelas caronas !!

As doutorandas Joanna Reis e Raquel Peralva, pela sua amizade, carinho, parceria, pelos momentos descontraídos que passamos, principalmente durante os almoços.

A doutoranda Ana Claudia Maretti, por me ajudar a dar os primeiros passos na biologia molecular, com toda sua paciência e dedicação.

Ao pesquisador Silvio Favoreto, pelas longas conversas no Skype. Obrigado pela paciência que sempre teve comigo, mesmo quando eu perguntava a mesma coisa por repetidas vezes. Agradeço ainda por toda a contribuição que você teve com o meu trabalho, sempre acreditando que os resultados encontrados eram bárbaros (rs).

Ao estudante de Iniciação Científica Francisco Dias, pela ajuda nos trabalhos de campo e na leitura de prontuários.

Agradeço aos alunos Natália Domingues, Josué Marcelo Almeida, Luzinei Couto e Liliane Almeida por sua contribuição ao trabalho.

Ao Ricardo dos Santos Nogueira, Eduardo Pinto e Carolina Mendes-Aguiar por sua contribuição na minha formação, sempre dispostos a ajudar. À Rosangela Leite Pelegrino pelas cópias, formulários e toda a parte burocrática.

As amigas de Mestrado, Carolina Rosadas, Fernanda Heloise e Priscila Ribeiro, pela amizade, parceria e carinho. Obrigado por ter me ensinado que sempre há alguém pior do que você rs.

Aos meus irmãos-amigos Roberta, Isadora, Thiago, Karina, Jefferson, Junior e Adele. Por saberem me escutar quando eu mais precisava, me tranquilizando nos momentos de desesperos.

Ao curso de Biologia Parasitária pela confiança, e à CNPq pelo apoio financeiro.

Índice

Lista de abreviaturas	viii
Lista de Tabela	xi
Lista de Figuras	xii
1. Resumo	xiv
2. Abstract	xv
3. Introdução	01
4. Justificativa	17
5. Objetivos	18
6. Metodologia	19
7. Resultados	29
8. Discussão	51
9. Conclusões	62
10. Referências Bibliográficas	63

Lista de abreviaturas

Ag-Lb: Antígeno de *Leishmania braziliensis*.

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência adquirida (da sigla em inglês *acquired immune deficiency syndrome*)

APC: Célula apresentadora de antígeno

BG: Controle negativo (da sigla *background*)

β 1: cadeia β 1 do receptor da IL-12

β 2: cadeia β 2 do receptor da IL-12

CD: do inglês *cluster of differentiation*

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

CE: Cura espontânea

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CMSP: Células mononucleares do sangue periférico

Con A: Concanavalina A

CPM: Contagem por minuto

CTLA-4: do inglês *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Deoxinucleotídeos trifosfatados (do inglês *deoxynucleotide triphosphatases*)

EEF1A1: Fator 1 alfa do alongamento eucariótico

Foxp3: do inglês *forkhead box p3*

FT: Fator transcricional

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GATA-3: do inglês *zinc-finger transcription factor-3*

GITR: Receptor de TNF induzido por glicocorticóide

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

IDRM: Intraderrmoreação de Montenegro

IFN- γ : Interferon-gama

IL: Interleucina

IL-4R: Receptor da interleucina-4

IL-12p35: Subunidade p35 da interleucina-12

IL-12p40: Subunidade p40 da interleucina-12

IL-12R: Receptor de interleucina-12

IPEC: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.
IE: Índice de estimulação
IS: Indivíduos sadios
Jak: Janus quinase
Log: Logaritmo
LC: Leishmaniose cutânea
LCC: Pacientes curados de leishmaniose cutânea
LM: Leishmaniose mucosa
LMC: Leishmaniose mucocutânea
LPG: Lipofosfoglicano
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
LV: Leishmaniose visceral
MHC: Complexo de histocompatibilidade principal (da sigla em inglês *major histocompatibility complex*).
N: Número de casos
NO: Óxido nítrico (da sigla em inglês: *nitric oxide*)
NK: do inglês *natural killer*
OMS/WHO: Organização Mundial de Saúde/ *World Health Organization*
PBS: Solução salina fosfatada tamponada (da sigla em inglês *phosphate buffer solution*)
PCR: Reação em cadeia de polimerase (da sigla em inglês *polymerase chain reaction*)
PP1A1: Ciclofilina A
PM: Peso molecular
RPL: Resposta proliferativa de linfócitos
RNAm: RNA mensageiro
RT-PCR: Transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase (do inglês *reverse transcription-polymerase chain reaction*)
SFB: Soro fetal bovino
STAT: Sinal transdutor e ativador de transcrição (da sigla em inglês: *signal transducer and activator of transcription*).
SVS: Secretaria de Vigilância Sanitária
TCR: Receptor de célula T (da sigla em inglês: *T cell receptor*)
Tyk: Tirosina quinase
TBX21/T-bet: da sigla em inglês *T-cell specific Tbox transcription factor*

Th1: Linfócitos T CD4⁺ do tipo 1

Th2: Linfócitos T CD4⁺ do tipo 2

Th17: Linfócitos Th17

Treg: Linfócitos T reguladores

TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa (da sigla em inglês *tumor factor necrosis factor-alfa*)

TGF- β : Fator de crescimento de transformação beta (do inglês: *transforming growth factor*)

Ubiquitin: Ubiquitina

Índice de Tabelas/Quadro:

Quadro 1 : Descrição e identificação das seqüências dos iniciadores e das sondas dos genes alvos	26
Tabela 1: Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes clinicamente curados de leishmaniose cutânea (LCC) após intervenção terapêutica e por cura espontânea (CE).	30
Tabela 2: Quantificação de RNA de citocinas e fatores transcricionais em células não-estimuladas e estimuladas com antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> (Ag-Lb) nos pacientes curados de leishmaniose cutânea.	41
Tabela 3: Quantificação de RNA de citocinas e fatores transcricionais em células não-estimuladas pelos antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> nos pacientes curados clinicamente de leishmaniose cutânea.	42
Tabela 4: Correlação entre a expressão de pares de genes de citocinas e fatores transcricionais obtidos de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> de amostras de indivíduos saudáveis.	44
Tabela 5: Correlação entre a expressão de pares de genes de citocinas e fatores transcricionais obtidos de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> de amostras de pacientes curados há menos de dois anos.	46
Tabela 6: Correlação entre a expressão de pares de genes de citocinas e fatores transcricionais obtidos de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> de amostras de pacientes curados há mais de dois anos.	48
Tabela 7: Correlação entre a expressão de pares de genes de citocinas e fatores transcricionais obtidos de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> de amostras de pacientes que evoluíram para cura espontânea.	50

Índice de Figuras:

Figura 1: Ciclo da <i>Leishmania sp.</i>	03
Figura 2: Representação esquemática da diferenciação de células T CD4 virgem nos fenótipos Th1, Th2, Th17 e Treg.	08
Figura 3: Índice de estimulação da resposta proliferativa de linfócitos em pacientes curados de leishmaniose cutânea, após o estímulo <i>in vitro</i> com antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> .	31
Figura 4: Avaliação da qualidade e integridade das amostras de RNA extraídas de células mononucleares de pacientes de leishmaniose cutânea curados clinicamente.	32
Figura 5: Expressão do fator transcricional <i>TBET</i> e do <i>IFNG</i> em células mononucleares de pacientes de leishmaniose cutânea curados clinicamente.	33
Figura 6: Expressão da subunidade p35 da citocina IL-12 (<i>IL12A</i>) e da <i>IL18</i> em células mononucleares de pacientes de leishmaniose cutânea curados clinicamente.	35
Figura 7: Expressão do fator transcricional <i>GATA3</i> em células mononucleares de pacientes de leishmaniose cutânea curados clinicamente.	36
Figura 8: Expressão de <i>IL4</i> e <i>IL5</i> em células mononucleares de pacientes de leishmaniose cutânea curados clinicamente.	37
Figura 9: Expressão do fator transcricional <i>FOXP3</i> e da <i>IL10</i> em células mononucleares de pacientes de leishmaniose cutânea curados clinicamente.	38
Figura 10: Expressão da razão <i>IFNG/IL10</i> e <i>TBET/GATA3</i> em células mononucleares de pacientes de leishmaniose cutânea curados clinicamente.	39
Figura 11: Correlação entre os níveis de expressão gênica de citocinas e fatores transcricionais associado ao perfil tipo 1, tipo 2 ou regulatório em amostras de indivíduos sadios (IS).	43

Figura 12: Correlação entre os níveis de expressão gênica de citocinas e fatores transcricionais associado ao perfil tipo 1, tipo 2 ou regulatório em amostras de pacientes curados há menos de dois anos (LCC<2a).	45
Figura 13: Correlação entre os níveis de expressão gênica de citocinas e fatores transcricionais associado ao perfil tipo 1, tipo 2 ou regulatório em amostras de pacientes curados há mais de dois anos (LCC<2a).	47
Figura 14: Correlação entre os níveis de expressão gênica de citocinas e fatores transcricionais associado ao perfil tipo 1, tipo 2 ou regulatório em amostras de pacientes que evoluíram para a cura espontânea (CE).	49

Resumo

O perfil de citocinas tipo 1, tipo 2 e reguladoras parece ser determinante para a cura clínica da leishmaniose tegumentar americana. No entanto, pouco se sabe sobre a resposta imune (RI) duradoura responsável pelo controle da infecção por *Leishmania* em indivíduos curados de leishmaniose cutânea (LC). É provável que o perfil da RI efetora e/ou reguladora desencadeada nesses indivíduos contribua para o desenvolvimento de estratégias vacinais promissoras. O T-bet, GATA-3 e Foxp3 são fatores transcricionais (FT), envolvidos na diferenciação de células T, apontados como moduladores da expressão de genes que codificam citocinas efetoras e reguladoras. Baseado nisso, nosso objetivo foi avaliar se os níveis de expressão gênica de citocinas do tipo 1 (*IFNG*, *IL12A*, *IL18*), tipo 2 (*IL4*, *IL5*), reguladoras (*IL10*) e, respectivamente, dos FT *TBET*, *GATA3* e *FOXP3*, em resposta aos antígenos de *Leishmania* estavam associados ao tempo de cura clínica da LC. Foram estudados: pacientes de LC curados há menos de dois anos (LCC<2a; n=11), curados há mais de dois anos (LCC>2a; n=10), ou que evoluíram para a cura espontânea (CE; n=05). O grupo controle foi constituído de indivíduos saudáveis, sem histórico de leishmaniose (IS; n=08). O RNAm foi extraído das células mononucleares de sangue periférico (CMSP) estimuladas *in vitro* com antígenos de *L. braziliensis*. Para a amplificação gênica, foram utilizadas placas de 96 poços contendo simultaneamente todos os iniciadores dos genes alvo, além dos genes constitutivos. O número de cópias de genes foi quantificado pela técnica de *PCR* em tempo real. Os resultados demonstraram que não houve alteração nos níveis de expressão de *TBET*, *GATA3*, *FOXP3* nos grupos de LCC estudados, mas os CE apresentaram níveis significativamente mais elevados para todos os FT analisados. Os LCC>2a tiveram redução na expressão de *IL12A* em comparação aos LCC<2a ($p<0,01$), mas não houve alteração em relação ao *IFNG*. Embora o número de cópias de *IL18*, *IL4* e *IL10* fosse mais baixo nos LCC>2a em relação aos LCC<2a, esta diferença não foi significativa. Além dos FT, os CE apresentaram expressão estatisticamente mais elevada de *IFNG*, *IL12A*, *IL4*, *IL5*, e *IL10*. Os resultados acima sugerem que os pacientes que curaram espontaneamente apresentaram uma maior capacidade de expressar citocinas do tipo 1, tipo 2 e reguladoras comparadas aos curados que receberam o tratamento. A redução da expressão de genes de citocinas efetoras e inibitórias com o aumento do tempo de cura sugere que este padrão esteja associado com uma resposta protetora bem modulada.

Abstract

The profile of Type 1 and Type 2 cytokines in addition to the expression of transcriptional regulators are determinant for the clinical cure of American tegumentary leishmaniasis (ATL). Despite of all investigation in the field, little is known about the progression of the immune response (RI) after the clinical cure (CL), when the parasite burden and excess inflammation is kept in check by a well regulated immune response. It is probable that the RI profile involving the expression of effector and regulatory molecules contributes to ensure the successful strategy for the immune response against the parasite. T-bet, GATA-3 and Foxp3 are transcriptional factors (TF), involved in differentiation of T cells, these molecules are modulators of gene expression that control effector and regulatory cytokines. Based on that, our aim was to associate the levels of cytokines gene expression of type 1 (*IFNG*, *IL12A*, *IL18*), type 2 (*IL4*, *IL5*) and regulatory molecules (*IL10*, *TBET*, *GATA3* and *FOXP3*) in response to *Leishmania* antigen, to clinical time of cure in CL. Were investigated patients of CL with less than two years of cure (CCL<2y; n=11), more than two years of cure (CCL>2y; n=10), or that evolved to spontaneous healing without intervention (SH; n=05). The control group was composed by healthy individuals, with no history of leishmaniasis (HI; n=08). Total RNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated *in vitro* with *L. braziliensis* antigens. The extracted RNA was used to quantify specific gene expression by Real Time PCR using customized assay kits. The experiments showed that there is no change in transcription for *TBET*, *GATA3* or *FOXP3* at studied CCL groups, however SH patients have significantly higher gene copy number for all analyzed TF. LCC>2a patients showed reduced expression of *IL12A* in comparison with LCC<2a ($p<0,01$), but yet the expression of *IFNG* was identical in both groups. There is a trend for lower gene copy numbers of *IL18*, *IL4* e *IL10* in LCC>2a in comparison with LCC<2a patients, but this difference was not statistically relevant. Besides increased expression of transcriptional regulators, CE patients showed significant increase in gene copy numbers for *IFNG*, *IL12A*, *IL4*, *IL5*, e *IL10*. Taken together, our results suggest that patients with spontaneous cure of leishmaniasis present a stronger Type 1, Type 2 and regulatory responses when compared to patients that developed progressive disease and received treatment. With increased time of cure, we observed a reduction on gene expression of effector and inhibitory cytokines. This phenomena may represent a pattern of well modulated protective immune response against the parasite.

1. Introdução

1.1 Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas consideradas um grande problema de saúde pública, com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A leishmaniose é encontrada em 88 países, sendo 72 países em desenvolvimento, dos quais 13 são considerados os menos desenvolvidos do mundo (Desjeux et al 2004). Estima-se que a incidência anual da doença fosse de 12 milhões de casos e a população em risco chegava a 350 milhões de pessoas, com 1 a 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar (LT) e 500.000 novos casos de leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2004)

A doença apresenta ainda ampla distribuição pelo território brasileiro, acometendo o homem em prevalências diferentes de acordo com as regiões geográficas do Brasil (revisto por Da-Cruz & Pirmez 2005).

Historicamente, a leishmaniose constitui uma zoonose típica, com reservatórios silvestres e vetores bem definidos, enquanto os humanos assumem o papel de hospedeiros acidentais. Entretanto, devido principalmente ao crescimento da população, urbanização, mudanças ambientais, e migração (êxodo rural), o homem passa a fazer parte do ciclo. Assim, a infecção tem se dado em diversas áreas num ambiente peridomiciliar ou até mesmo domiciliar, onde a adaptação do vetor permite a transmissão do parasito para animais domésticos e homem, fazendo com que a probabilidade de contaminação seja semelhante à população de risco, não importando a faixa etária, sexo ou atividade profissional (SVS/MS, 2007).

Em todo o mundo, tem sido observado um agravamento dos casos de leishmanioses devido a vários fatores, dentre eles resistência aos medicamentos e imunossupressão do hospedeiro, seja por subnutrição ou por associação a outras doenças, principalmente a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Da-Cruz et al 2000).

1.2 Agente etiológico

Os agentes etiológicos da leishmaniose pertencem ao filo Protozoa, subfilo Sarcocystophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família

Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Rey, 2001). Existem diversas espécies de *Leishmania*, das quais cerca de treze estão associadas à doença humana (Grimaldi et al 1989). Segundo a classificação taxonômica das espécies proposta por Lainson e Shaw (1987), as espécies de *Leishmania* são divididas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. No Brasil, as principais espécies que produzem lesão tegumentar são *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, sendo a *L. braziliensis* a espécie mais comumente encontrada.

A *Leishmania* é um parasito digenético, cujo ciclo vital se passa num hospedeiro vertebrado e invertebrado, apresentando-se sob duas formas evolutivas: amastigota, que são estruturas arredondadas, com flagelo interiorizado, que se localizam em células fagocitárias de vertebrados, sobretudo macrófagos; e promastigota, que são formas alongadas, provida de flagelo livre, e que se desenvolve no tubo digestivo do inseto vetor (Rey, 2001, revisto por Da-Cruz & Pirmez 2005).

1.3 Ciclo de vida da *Leishmania*

A infecção por *Leishmania* tipicamente origina-se através da picada de dípteros pertencentes tanto ao gênero *Phlebotomus*, que estão associadas às espécies do Velho Mundo, como ao gênero *Lutzomyia*, que hospeda as espécies do Novo Mundo. Esses insetos são pequenos (2 a 3 mm), de coloração acastanhada, pousam com asas elevadas, têm hábitos vespertinos e seus vôos são curtos. Atualmente, são conhecidas em torno de 500 espécies de flebotomíneos, mas apenas cerca de 30 delas foram positivamente identificadas como vetores da doença. Somente as fêmeas são hematófagas e, portanto possíveis vetores capazes de transmitir o parasito ao hospedeiro vertebrado durante a hematofagia (Cunningham, 2002).

A contaminação das fêmeas dos flebótomos acontece através da ingestão de células fagocíticas parasitadas durante o seu repasto sanguíneo (**Figura 1**). No trato digestivo do inseto, o parasito se replica e transforma-se na forma promastigota procíclica. Estas possuem moléculas de lipofosfoglicano (LPG) e metaloproteinase gp63 que apresentam um papel importante na sobrevivência do parasito e na modulação da resposta imune do hospedeiro (revisto por Olivier M et al 2005). As formas promastigotas procíclicas passam então por um processo de metaciclogênese, transformando-se nas formas infectivas (promastigotas metacíclicas) e migrando para as porções anteriores do tubo digestivo do vetor (Rogers et al 2002).

Quando um flebótomo infectado realiza um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, ele regurgita as formas infectivas, e algumas destas evadem da destruição pelo sistema imune do hospedeiro, antes mesmo de infectarem os macrófagos. Um dos primeiros mecanismos de escape das promastigotas é evitar a lise direta através do sistema complemento, tendo a participação de glicoproteínas e açúcares da membrana do parasito, LPG e metaloproteinase gp63. Além de fatores inerentes ao parasito, tem sido demonstrado que alguns componentes da saliva do inseto induzem um ambiente favorável para o estabelecimento do parasito (Alexander et al 1999, Gillespie et al 2000, Menezes et al 2008). Uma das moléculas mais investigadas é a Maxadilan (Max), presente nas glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis*, que inibe as funções das células T e dos macrófagos em relação à produção de NO, H₂O₂ e a secreção de IL-12 e TNF- α , acentuando assim a sobrevivência do parasito, principalmente na fase inicial da infecção. (Gillespie et al 2000, Brodie et al 2007).

Após escaparem do meio extracelular, os parasitos se ligam à superfície dos macrófagos, e em seguida são endocitados em um vacúolo parasitóforo, no qual se fundem aos lisossomas das células, criando um microambiente que induz a transformação da forma promastigota em amastigota, facilitando sua sobrevivência, visto que sob essa forma, o parasito apresenta-se mais resistente à resposta oxidativa desencadeada pela célula hospedeira (Cunningham, 2002).

As amastigotas então se multiplicam, rompem as células, e são fagocitadas por novas células propagando a infecção, ou sendo ingeridas por outro inseto vetor fechando o ciclo.

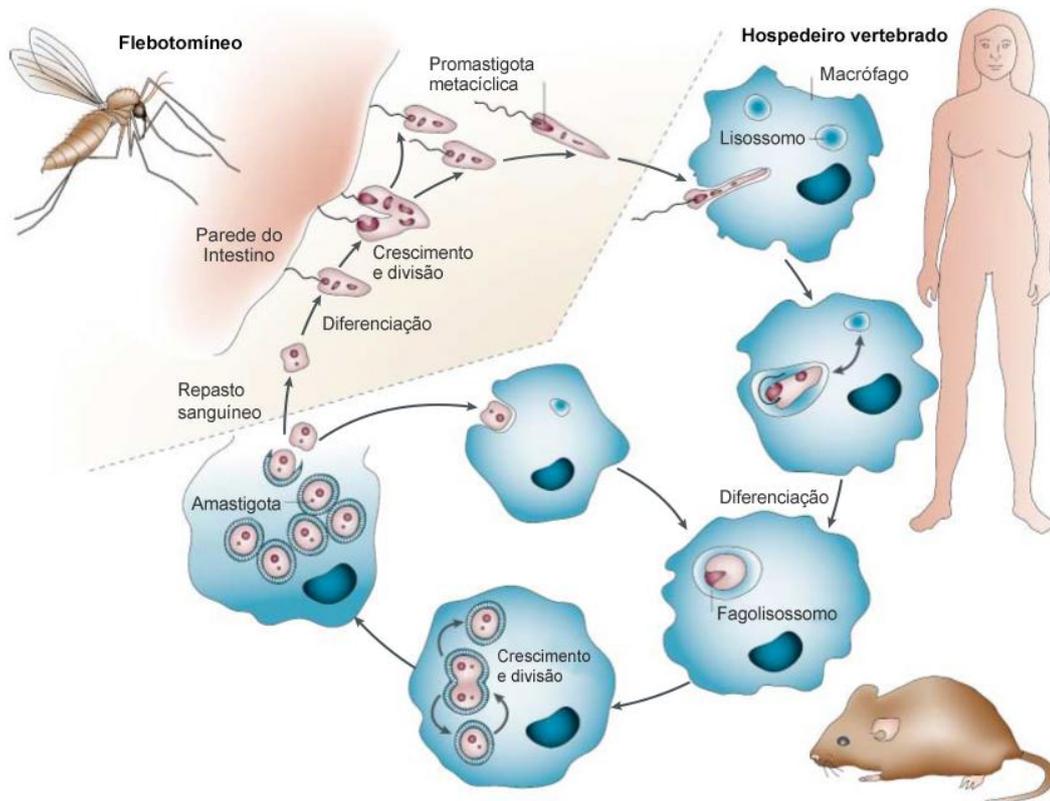


Figura 1- Ciclo da *Leishmania sp.* Fonte: Sacks & Noben-Trauth, 2002.

1.4 Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que vão desde infecções assintomáticas ou lesões cutâneas, geralmente benignas, a lesões destrutivas encontradas na forma mucosa. A evolução para as diferentes formas clínicas está na dependência de variáveis como virulência do parasito, características biológicas do vetor, além da constituição genética e imunológica do hospedeiro.

No Brasil são registradas anualmente cerca de 20.000 novos casos de LTA (SVS/MS, 2008), sendo a maioria causada pela espécie *L. (V.) braziliensis*. As principais formas de apresentação clínica são: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose disseminada (LDiss) (revisto por Da-Cruz & Pirmez, 2005).

A LC é a forma clínica mais freqüente, podendo ser causada por qualquer uma das espécies dermatrópicas de *Leishmania*. O primeiro sinal da infecção é tipicamente um pequeno eritema que desenvolve após um período de incubação variável no sítio

onde ocorreu a picada do inseto. O eritema evolui geralmente para uma pápula, em seguida num nódulo, que ulcera progressivamente durante um período de duas semanas a seis meses para se tornar então uma lesão característica da LC (Reithinger et al 2007). As lesões são geralmente únicas ou em pequeno número e podem ser curadas espontaneamente num período de meses ou anos (Costa et al 1987) ou após a intervenção terapêutica específica (Oliveira-Neto et al 1998). Ao regredirem, as feridas deixam cicatrizes em geral lisas, brilhantes, finas e sedosas, com dimensões que se mantêm nos limites da úlcera, hipopigmentadas, mas podendo assumir o colorido natural da pele. No entanto, a ocorrência de traumatismo pode facilitar o surgimento de lesão leishmaniótica, levando à reativação da infecção na borda da cicatriz, provavelmente relacionada à manutenção do parasito nestes locais (Schubach et al 1998, revisto por Da-Cruz & Pirmez, 2005).

Cerca de 3 a 5% de pacientes LC causados por *L. braziliensis* desenvolvem a forma mucosa (Marsden et al 1986), uma forma mais grave, caracterizada por lesões destrutivas na cavidade oral e nasofaríngea. Além disso, esta doença caracteriza-se por apresentar uma reação de hipersensibilidade tardia (intraderrmorreação de Montenegro, IDRM) fortemente positiva, e títulos elevados de anticorpos, porém com difícil confirmação parasitológica devido à escassez parasitária. Em geral as lesões de LM são mais resistentes ao tratamento, exigindo doses maiores de drogas e recidivando com mais freqüência que a forma cutânea (revisto por Da-Cruz & Pirmez, 2005).

Uma manifestação clínica que vem sendo distinguida da LM e da LC é a leishmaniose mucocutânea (LMC). Neste caso, o comprometimento da mucosa ocorre logo após o aparecimento das lesões cutâneas, fazendo com que a doença apresente uma duração mais curta quando comparado com a LM. Além disso, enquanto que na LC é mais freqüente o aparecimento de uma úlcera única, na LMC é mais comum o aparecimento de mais de uma lesão cutânea (Oliveira-Neto et al 2000).

A LCD é uma apresentação clínica geralmente causada pela *L. amazonensis* no Brasil (Grimaldi et al 1993). Esta manifestação rara representa uma forma anérgica da LTA, cuja depressão da resposta imune específica a *Leishmania* leva a uma acentuada proliferação de parasitos e conseqüente disseminação da infecção (Silveira et al 2009).

A LDiss é uma manifestação clínica distinta tanto da forma clássica da LC, como da LCD. Ela é caracterizada por apresentar lesões pleomórficas múltiplas, papulares, nodulares e/ou acneiformes, com escassez ou ausência de parasitos nos tecidos afetados. A lesão normalmente inicia-se com uma ou poucas pápulas e

rapidamente há o aparecimento de diversas lesões espalhadas por toda a superfície do corpo (Turetz et al 2002).

1.5 Tratamento e cura clínica

Existem relatos de indivíduos que têm a capacidade de curar espontaneamente as lesões de LTA, podendo este evento levar meses até anos (Marsden et al 1984a). Carvalho e colaboradores (1995) demonstraram que pacientes curados espontaneamente encontrados em áreas endêmicas de infecção por *L. braziliensis*, exibem uma forte resposta de linfócitos T específicos aos antígenos de *Leishmania*, sendo esta resposta comparável a desenvolvida pelos pacientes de LM. Este estudo, juntamente com os achados de Marsden e colaboradores (1984) sugerem que pacientes que não foram tratados ou que tiveram falha terapêutica devido ao abandono ou tratamento irregular, apresentam um risco maior de desenvolver a forma mucosa quando comparado com os pacientes que curaram após um tratamento adequado. Desse modo, o tratamento na LTA é uma importante medida de controle para prevenir um posterior desenvolvimento da forma mucosa e uma forma eficaz de curar as lesões cutâneas em um curto período de tempo.

O tratamento para a leishmaniose no Brasil é baseado primariamente na administração do antimonial pentavalente N-metilglucamina (Glucantime – Rhodia, SP, Brasil) via intramuscular ou intravenosa. O esquema terapêutico recomendado pela OMS corresponde à administração de 10-20mg/kg/dia durante 20 dias (no caso da LC) e 20mg/kg/dia durante o período de 30 dias (no caso da LM). Caso haja necessidade, essa série pode ser repetida novamente. Se mesmo assim não houver uma resposta satisfatória ao final do tratamento, esta série pode ser repetida novamente ou alternativamente utilizar-se uma droga de segunda escolha como a anfotericina B (SVS/MS, 2008).

Os antimoniais pentavalentes são considerados drogas leishmanicidas, pela sua capacidade de interferir na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Apesar de não se saber ao certo o mecanismo de ação dessas drogas na leishmaniose, acredita-se que este possa estar envolvido com a inibição da síntese de ATP (Berman et al 1988).

O tratamento com antimonial apesar de ter se mostrado eficaz, apresenta diversas desvantagens. A necessidade de várias aplicações por um longo período de tempo leva muitas vezes ao abandono do tratamento pelo paciente. Além disso, o

antimonial apresenta um alto custo e uma alta toxicidade levando a vários efeitos adversos já conhecidos como: artralgia, náusea, alterações renais e cardíacas, dentre outros (SVS/MS, 2006).

A resposta ao tratamento com drogas antimoniais varia consideravelmente dependendo da cepa de parasito envolvida, do “status” imune do pacientes e da forma clínica ou estágio da doença (Grogl et al 1992). O tratamento é geralmente eficaz nos pacientes LC e nos pacientes de leishmaniose visceral (LV), entretanto pacientes com LM são menos responsivos à terapia (Marsden et al 1986). Além disso, LCD é uma das manifestações clínicas que apresenta à maior dificuldade em evoluir para a cura, devido à anergia da resposta imune desenvolvida por esses pacientes (Convit et al 1965, Costa et al 1992).

Sendo assim, a quimioterapia associada com a resistência a drogas e a toxicidade enfatiza a necessidade de desenvolver uma vacina contra a leishmaniose, a qual promova uma resposta imune modulada, capaz de prevenir a infecção (Coler et al 2005).

O critério de cura é clínico. Na forma cutânea, o paciente é considerado curado quando ocorre a re-epitelização das lesões ulceradas ou não-ulceradas e regressão total da infiltração e eritema até três meses após a conclusão do esquema terapêutico. Na forma mucosa é definido pela regressão de todos os sinais, e comprovado pelo exame otorrinolaringológico, até seis meses após a conclusão do esquema terapêutico (Mattos, 2006).

Recomenda-se acompanhamento mensal por três meses consecutivos após a cura clínica, seguido do acompanhamento pelo menos uma vez ao ano durante o período de cinco anos, pois este parece ser o período em que ocorre o maior número de casos de reativação da doença (SVS/MS, 2007).

1.6 Desenvolvimento e estabilidade do perfil de resposta imune

Diversos fatores contribuem para a polarização do perfil de resposta imune de células T ativadas, incluindo a natureza e a dose do antígeno, o tipo de célula apresentadora de antígeno (APC), a participação de moléculas co-estimulatórias, a estrutura da cromatina e principalmente as citocinas presentes no ambiente local da célula no momento da interação (Murphy et al 2000, Chakir et al 2003, revisto por

Agnelo et al 2003). Esses diversos fatores desencadeiam sinalizações intracelulares que culminam em ativação ou supressão de genes responsáveis pela determinação do tipo de resposta imune.

As células T CD4⁺ virgens podem-se diferenciar funcionalmente em pelo menos quatro grupos principais de células efetoras: células T auxiliares do tipo 1 (Th1), do tipo 2 (Th2), células T reguladoras (Treg) e Th17, conforme definido principalmente pelos seus padrões de produção de citocinas e expressão de fatores transcricionais (revisto por Iwakura et al 2006) (**Figura 2**).

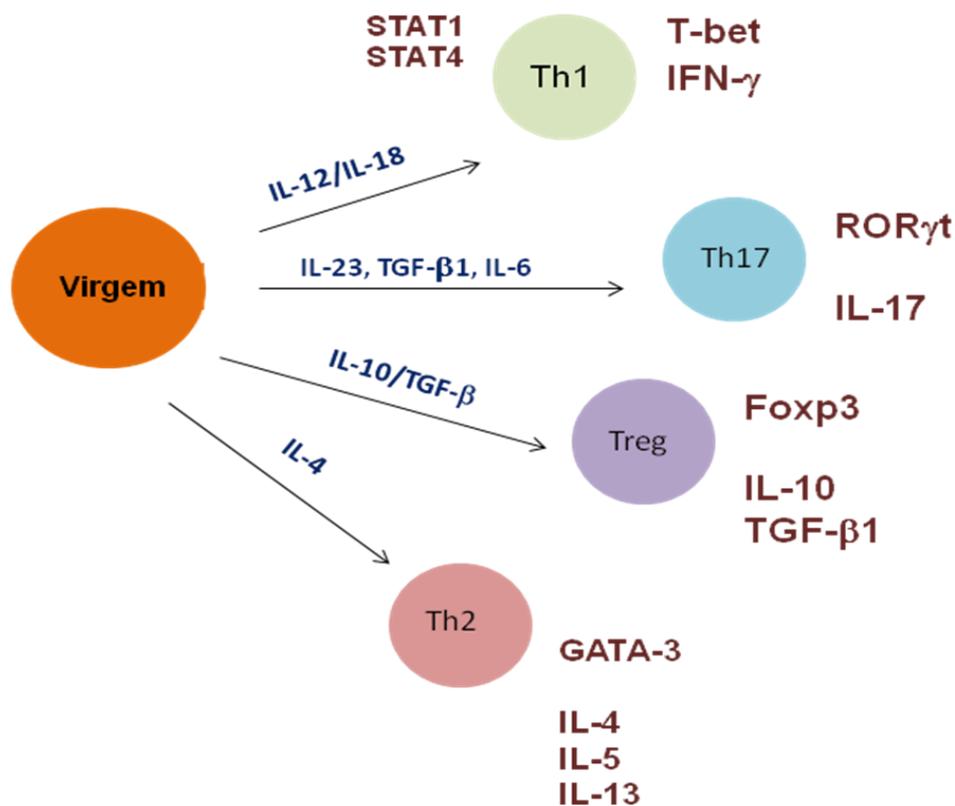


Figura 2 – Representação esquemática da diferenciação de células T CD4 virgem nos fenótipos Th1, Th2, Th7 e Treg. Fonte: Iwakura & Ishigame, 2006

As células tipo 1 são caracterizadas por produzirem citocinas como interferon (IFN)- γ e promoverem a imunidade celular, que é fundamental para o controle de patógenos intracelulares como *Leishmania sp* e *Mycobacterium tuberculosis*. O IFN- γ ativa macrófagos, acentuando a sua habilidade de fagocitose e de destruição de microrganismos. Além disso, citocinas do tipo 1 são observadas em casos de inflamação crônica e certas doenças auto-imunes. Por outro lado, células efetoras Th2 produzem

interleucinas (IL)-4, IL-5 e IL-13 e promovem a imunidade humoral, reações alérgicas a antígenos presentes no ambiente e resistência a infecções por helmintos (revisto por Agnelo et al 2003, Sallusto et al 2009).

Em suma, uma célula T CD4⁺ virgem é ativada através da apresentação de antígenos por uma APC. Uma vez ativada, as células começam a proliferar e a secretar IL-2, e passam a expressar o receptor de IL-12 (IL-12R) na sua superfície. O IL-12R é formado por duas subunidades, β 1 e β 2 (Chua et al 1995, Presky et al 1996, Lyakh et al 2008), sendo a subunidade β 1 capaz de se associar a Janus kinase (Jak) Tyk2 e se ligar a IL-12p40, e a subunidade β 2 capaz de se associar a Jak2 e se ligar tanto ao heterodímero como a subunidade p35. A sinalização através do IL-12R induz fosforilação, dimerização e translocação nuclear de diversos transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STAT), entretanto a resposta biológica tem sido atribuída à capacidade da subunidade β 2 de transduzir o sinal, através de resíduos de tirosina na sua porção intracelular que são capazes de se ligar ao sinal transdutor e ativador de transcrição 4 (STAT-4) (Szabo et al 1997, revisto por Agnelo et al 2003). O STAT-4 atua diretamente na região promotora do gene do *IFNG*, e esta citocina uma vez produzida, induz a transcrição do fator transcricional “T-box” (TBX21 também denominado T-bet) que promove a expressão na superfície da célula de IL-12R β 2 e a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺, estabelecendo a base para um “feedback” positivo (revisto por Agnelo et al 2003).

Apesar de T-bet regular diretamente a expressão de *IFNG* em linfócitos CD4⁺, esta citocina também pode ser produzida por outros tipos de células como “*natural killer*” (NK) e células T citotóxicas CD8 (Szabo et al 2000). Entretanto, Szabo e colaboradores (2002) demonstraram que este fator transcricional é necessário para o controle da produção de IFN- γ em células NK e CD4, mas não em CD8. Dessa forma, a regulação de uma única citocina, é controlada por mecanismos transcricionais distintos numa mesma linhagem de células. O fator transcricional T-bet é capaz ainda de suprimir a produção de IL-4 e IL-5 em células Th2 por um mecanismo de inibição da atividade da proteína 3 ligadora de GATA (GATA-3), favorecendo então o desenvolvimento de um fenótipo Th1 e inibindo o desenvolvimento de um fenótipo Th2. Esta habilidade de T-bet inibir a ação de GATA-3 parece ser mais essencial na diferenciação de células do tipo 1, do que na capacidade de T-bet diretamente afetar a transcrição de *IFNG*, pois células deficientes de T-bet mantêm a sua acessibilidade a região promotora do gene do

IFNG, indicando que outras vias podem estar participando na expressão desta citocina (Szabo et al 2000, Usui et al 2006).

Por outro lado, a diferenciação das células T para o perfil Th2 é dependente de IL-4, que uma vez secretado no ambiente, se liga ao seu receptor (IL-4R) e ativa outro membro da família STAT, o STAT6. Uma vez ativado, STAT6 é capaz de se translocar para o núcleo, e induzir a expressão de genes específicos para o perfil Th2, como o de GATA-3 (Murphy et al 2002, Zhou et al 2003).

O GATA-3 é um importante fator transcricional requerido para a diferenciação e manutenção do fenótipo Th2 (Zheng et al 1997, Zhu et al 2006). Sua atividade está diretamente associada com a transativação da região promotora do gene que codifica para *IL5*; além da capacidade de acentuar a expressão genes de *IL4* e *IL13* (Pai et al 2003). Além de coordenar a regulação do locus *IL-4/IL-5/IL-13*, GATA-3 pode controlar ainda a produção de IL-10 através da mudança na estrutura da cromatina, mesmo na ausência de IL-4 (Shoemaker et al 2006). Sendo assim, GATA-3 não é importante apenas para a indução de genes de citocinas Th2, mas também para a supressão do desenvolvimento do perfil Th1, através de mecanismos que parecem ser independentes de IL-4 (Ouyang et al 1998).

Além de células de perfil tipo 1 e tipo 2, subpopulações de linfócitos T reguladores (Treg) tem surgido como um novo grupo de linfócitos CD4⁺CD25⁺ que apresentam um papel fundamental na preservação da homeostase do hospedeiro. Essas células constituem 5 - 10% de linfócitos T CD4⁺ em humanos e roedores e são fenotipicamente definidas pela expressão constitutiva da cadeia α do receptor da IL-2 (CD25). Além do CD25, as Treg podem ser marcadas pela expressão de antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4), receptor de TNF induzido por glicocorticóide (GITR), CD103 e “CD45RB^{low}” (Mchugh et al 2002). Adicionalmente a essas moléculas, o fator transcricional Foxp3 tem surgido como um novo marcador molecular, essencial para o desenvolvimento e função das células T reguladoras. Este fator é especificamente expresso em células Treg, e ao contrário dos outras moléculas como CD25 e CTLA-4, não é regulado por outras populações de células durante a ativação das mesmas (Belkaid et al, 2003, Bluestone et al 2003).

Existem dois grupos de Treg, que diferem em relação à especificidade e ao mecanismo efetor: células Treg naturais (nTreg) ou também denominadas derivadas do timo e células Treg induzidas por antígeno (iTreg) ou Treg adaptativa (Bluestone et al 2003, Damoiseaux et al 2006).

As Treg naturais são desenvolvidas durante o processo tímico de maturação de células T, resultando numa população capaz de reconhecer antígenos próprios e suprimir o efeito deletério de células T auto-reativas, mantendo a tolerância ao próprio. Seu principal mecanismo de ação supressora parece ser independente de citocinas, envolvendo diretamente uma via dependente de contato com células T respondedoras ou APC (revisto por Bluestone et al 2003, Wing K et al 2010).

Já as iTreg são caracterizadas por se desenvolverem a partir de uma célula T virgem durante a resposta imune, sob condições particulares de exposição ao antígeno ou co-estimulação. Deve-se destacar que dentro deste grupo podemos encontrar ainda células Tr1 e Th3 que são marcadas pela alta produção das citocinas IL-10 e TGF- β respectivamente (Belkaid, 2003, Bluestone et al 2003).

De fato, a redescoberta das células T supressoras tem modificado o conceito de homeostase na imunologia. Enquanto a patologia de muitas doenças ainda pode ser explicada pelo paradigma Th1/Th2, a regulação de ambos os perfis parece estar diretamente envolvido com a combinação entre nTreg e iTreg, circunstância capaz de manter um controle entre a resposta Th1 e Th2 (Damoiseaux et al 2006).

Estudos recentes têm demonstrado a existência de uma nova população de células T, produtoras de IL-17 (Th17) com funções efetoras distintas daquelas identificadas em células Th1 e Th2 (Castellino et al 2006, Bi et al 2006).

Os linfócitos TCD4⁺ virgens em presença de TGF- β , IL-1 β e IL-6 induzem a diferenciação das células para o perfil Th17. Além destes dois mediadores mencionados, a IL-23 surge como uma nova citocina da família da IL-12 capaz de expandir e manter este fenótipo linfocitário (Awasthi et al 2009). A IL-17 pertence a uma família que contém seis membros (IL-17A-F) e cinco receptores (IL-17RA-RAD) (Li et al 2000). De todos os membros, a melhor caracterizada é a IL-17A, a qual é secretada por células TCD4⁺, Th17. Apesar de ser produzida durante a resposta imune adaptativa, a IL-17 também pode funcionar como molécula efetora da imunidade inata, assim como IL-1 β e TNF- α . Dessa forma, esta citocina é capaz de fazer com que a imunidade adaptativa se comunique com a imunidade inata, promovendo a inflamação (Harrington et al 2006).

Os subconjuntos de linfócitos T e padrões específicos de citocinas são definidos por fatores transcricionais específicos à linhagem. A diferenciação para o perfil Th1 requer STAT-4, STAT-1 e T-bet. Do mesmo modo, STAT-6 e GATA-3 são importantes

para a diferenciação para o perfil Th2. A Th17 foi identificada inicialmente por ser uma linhagem independente dos fatores transcritoriais encontrados em células Th1 e Th2. As citocinas como IL-6, IL-21 e IL-23 são mediadores fundamentais para o desenvolvimento do perfil Th17 e são capazes de induzirem a fosforilação de STAT-3, ação que potencializa a geração desta célula, através da regulação do receptor da IL-23 (IL-23R) e da expressão de IL-21. Além de STAT-3, o ROR γ t tem surgido como um novo fator transcritorial essencial para o desenvolvimento e polarização das células Th17 (Ivanov et al 2006, Awasthi et al 2009).

1.7 Resposta imune na Leishmaniose Tegumentar Americana

A ativação de uma resposta imune efetora desenvolvida pelos pacientes acometidos pela LTA é caracterizada pela capacidade de desencadear uma reação de hipersensibilidade tardia e de induzir a expansão de linfócitos T circulantes específicos ao antígeno de *Leishmania* (Carvalho et al 1985, Convit et al 1993).

Em todas as formas clínicas da LTA, a ativação da resposta imune é dependente de células T e de maneira geral, se aceita que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* esteja relacionada ao balanço entre as células Th1 e Th2 (Pirmez et al 1993, Bacellar et al 2002). No entanto, acredita-se que além da dicotomia Th1/Th2, mecanismos imunomodulatórios estejam presentes e sejam importantes para a evolução clínica dos pacientes.

Os pacientes de LC são caracterizados por apresentarem positividade no teste de IDRM e em testes *in vitro*, como os ensaios de proliferação celular frente a antígenos de *Leishmania* (Castés et al 1983). Entretanto, durante as fases iniciais da infecção por *L. braziliensis*, ocorre uma depressão transitória da resposta imune do tipo 1, caracterizada pela ausência da hipersensibilidade do tipo tardia, resposta linfoproliferativa (RPL) e pela produção de IFN- γ (Rocha et al 1999). Com o aumento do tempo de evolução da doença, ocorre a modificação desse padrão de resposta imune, levando ao predomínio de citocinas do tipo 1 e uma resposta específica ao parasito bem modulada. Isso reflete a tendência à cura espontânea e a boa resposta ao tratamento. Por isso, a LC é considerada uma doença de caráter benigno que se resolve, na maior parte das vezes, alguns meses, mesmo na ausência de tratamento (revisto por Da-Cruz & Pirmez, 2005).

Na LCD observa-se uma anergia da resposta imune celular, o que leva a ausência de reatividade de células T aos antígenos de *Leishmania*, tanto *in vivo* (IDRM), quanto *in vitro* (RPL). Além disso, a carência na produção de IFN- γ e o predomínio de uma resposta do tipo 2 resulta na deficiência na ativação de macrófagos, aumentando a proliferação parasitária, o número de lesões e favorecendo a disseminação da infecção (Coutinho et al 1987, Convit et al 1993). Apesar da ausência de resposta imune celular, os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes são altos. O perfil de citocinas é predominantemente do tipo 2, com elevada produção de IL-10 e baixos níveis de IFN- γ . A resposta insatisfatória ao tratamento é associada provavelmente à ausência de resposta imune celular específica nesses pacientes (Silveira et al 2009).

Na LM, a IDRM é fortemente positiva, com áreas de endureção cutânea significativamente superiores às encontradas em LC. Além disso, esta forma clínica é caracterizada por uma intensa resposta linfoproliferativa, por uma elevada produção de IFN- γ e TNF- α e pela reduzida secreção de IL-10, o que contribui para uma modulação inadequada da resposta imune, favorecendo a exacerbação da doença. (Bacellar et al 2002, Da-Cruz et al 2002, Carvalho et al 2007).

Citocinas como IFN- γ e TNF- α são necessárias para a morte da leishmânia; porém, esses mediadores em níveis elevados podem gerar o recrutamento de células inflamatórias no sítio infeccioso e levar a destruição do tecido. Apesar de IFN- γ e TNF- α participarem de um importante mecanismo de defesa contra o parasito, diversos estudos têm demonstrado que o controle da doença e a cura não são seguidos de esterilização, persistindo assim um pequeno número de parasitos no hospedeiro humano no sítio primário da infecção e no linfonodo (Aebischer T et al 1994). Dessa forma, a super produção de citocinas inflamatórias não necessariamente leva a destruição total do parasito, e pode ser ainda muito prejudicial ao hospedeiro.

Além das citocinas citadas anteriormente, outra molécula que também tem sido associada com o processo de inflamação é a IL-17. Bacellar e colaboradores (2009) demonstraram que a produção desta citocina por CMSP é acentuada durante o curso da infecção por LC e LM, e que a IL-17 está presente nas lesões causadas por *L. braziliensis*. Além disso, foi observada uma associação entre o número de células expressando IL-17 e a intensidade do infiltrado inflamatório, e uma correlação positiva entre a IL-17 e TNF- α , sugerindo a participação desta molécula na patogênese da LTA.

A exacerbação da resposta imune na LM pode ser explicada pela dificuldade destes pacientes em produzir IL-10 (Ribeiro-de-Jesus et al 1998, Gomes-Silva et al 2007), apesar de Faria e colaboradores (2005) terem mostrado que o número de células que expressam IL-10 *in situ* é semelhante entre os pacientes LC e LM. No entanto, como o infiltrado inflamatório nas lesões de LM é maior, acredita-se que a percentagem de células IL-10 positivas seja menor nestes pacientes. O prejuízo na produção de IL-10 parece estar associado também à capacidade do IFN- γ em regular a expressão do receptor de IL-10 (IL-10R) em linfócitos, e conseqüentemente inibir o efeito modulatório desta molécula (Faria et al 2005).

Juntamente com a IL-10, TGF- β é citado como uma citocina capaz de modular a resposta imune na leishmaniose. Sua função reguladora foi demonstrada em pacientes com LM, pois a ausência desta citocina resultou no aumento dos níveis de IFN- γ e TNF- α (Bacellar et al 2002).

Além das citocinas, estudos têm demonstrado que a presença de Treg pode controlar um grande número de infecções, por modular a intensidade da resposta imune efetora (Rouse et al 2004). No modelo murino de infecção por *L. major*, células Treg favorecem a sobrevivência do parasito em camundongos geneticamente resistentes, acumulando-se em sítios da infecção, e controlando a função de células T efetoras (Belkaid et al 2002). Na leishmaniose humana, Campanelli e colaboradores (2006) mostraram que células Treg naturais podem ser encontradas nas lesões de pacientes com LC, suprimindo a resposta imune, favorecendo a persistência do parasito na lesão (imunidade concomitante) e contribuindo para o controle local da função efetora de células T.

Além da supressão da proliferação e da inibição da secreção de citocinas, outro mecanismo de ação descrito para Treg é a indução da apoptose de células efetoras (Yolcu et al 2008). Neste contexto, Carneiro e colaboradores (2009) demonstraram uma associação positiva entre moléculas relacionadas à apoptose, como caspase-3 e Fas ligante (FasL), e Foxp3 nas lesões de pacientes de LC e LM, sugerindo que a apoptose pode ser um possível mecanismo de ação das Tregs nestas formas clínicas.

A LM é a forma clínica mais susceptível a reativações, quando comparada com a LC. Porém, não se sabe exatamente o que leva um paciente a ter episódios de reativação no curso evolutivo da doença. Tuon e colaboradores (2008), acompanhando pacientes de LM mostraram que os pacientes que apresentaram um número elevado de células

TCD8+ e NK, e um baixo número de macrófagos no tecido, além de uma razão elevada de IFN- γ /IL-10 apresentam maiores riscos de reativação da doença. Por outro lado, pacientes com uma modulação adequada da resposta imune no tecido, são capazes de atingirem uma cura clínica mais estável após a terapia.

Durante a fase ativa da LC, a caracterização do perfil fenotípico de linfócitos T reativos à *Leishmania* demonstra que há uma indução preferencial de células TCD4+. Entretanto, ao final do tratamento, há uma diminuição dessas células e um aumento das células TCD8+, resultando num equilíbrio entre essas duas subpopulações de linfócitos. Dados semelhantes foram encontrados para os pacientes na fase ativa de LM, sendo que o equilíbrio entre células TCD4/CD8 não foi observado após o tratamento. Este fato pode ser relacionado com a gravidade desta forma clínica, que necessita de períodos longos para a resolução total da lesão. De fato, a resolução da lesão mucosa é geralmente seis meses após o tratamento, enquanto as lesões de LC são frequentemente curadas mesmo antes do término da terapia.

Com o intuito de tentar compreender os mecanismos que são desenvolvidos em indivíduos que são capazes de controlar a infecção através do desenvolvimento de uma resposta imune apropriada, estudos têm buscado avaliar pacientes curados clinicamente da LTA e indivíduos assintomáticos.

Após a cura é observada uma redução nos níveis de IL-4 e TNF- α nos pacientes de LM (Da-Cruz et al 1996, Da-Cruz et al 2002), apesar dos níveis de IFN- γ parecerem ser mantidos (Da-Cruz et al 2002).

O bom prognóstico observado nos pacientes curados de LC e assintomáticos podem ser associados a níveis adequados de IL-10. Bittar e colaboradores (2007) mostraram que apesar dos indivíduos assintomáticos apresentarem baixa produção de IFN- γ , a produção de IL-10 nestes indivíduos é bastante elevada, o que deve ter contribuído para que ocorresse o controle da infecção sem o desenvolvimento da doença.

Outro parâmetro que pode ser utilizado para prever a evolução clínica ou a resposta ao tratamento é a razão IFN- γ /IL-10. Após a cura da leishmaniose, a razão IFN- γ /IL-10 é similar nos indivíduos assintomáticos, nos indivíduos que evoluíram para a cura espontânea e nos indivíduos curados da leishmaniose cutânea. Contudo, os pacientes curados da LM mantiveram uma razão elevada, provavelmente devido a sua

incapacidade de modular a reação inflamatória exacerbada, acentuada por uma baixa produção de IL-10 (Gomes-Silva et al 2007).

Além da produção de citocinas pela resposta imune do hospedeiro, o estudo de polimorfismos pode contribuir para o entendimento de fatores que levam alguns indivíduos a desenvolverem a doença e outros se manterem naturalmente imunes a infecção.

Variações genéticas como os polimorfismos de base única (SNPs) podem ocorrer em genes para algumas citocinas incluindo o *IFNG* e o *IL10* que irão determinar uma maior ou menor transcrição gênica de acordo com o genótipo apresentado pelo indivíduo (Matos et al 2007, Salhi et al 2009). Experimentos avaliando o polimorfismo -819C/T e -592A/C presentes na região promotora do gene da *IL10* em pacientes curados de leishmaniose cutânea e indivíduos assintomáticos demonstraram que o genótipo *IL10*-819C/C foi associado com altos níveis de produção desta citocina, favorecendo a regulação da mesma, a modificação do sítio de ligação de fatores nucleares e o aumento do risco de adquirir uma lesão.

Sendo assim, a modulação da resposta imune parece ser um fator fundamental na evolução dos pacientes de LTA para a cura clínica. No entanto, ainda não se sabe quais são os principais fatores que fazem com que alguns indivíduos sejam capazes de curarem espontaneamente e outros necessitem de uma intervenção terapêutica para alcançarem a cura; e como é o comportamento da resposta imune desses indivíduos longo tempo pós-cura que possa fazer com que eles mantenham o controle do parasito ou tenham algum episódio de reativação.

Justificativa

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, constituindo-se um importante problema de saúde pública, devido à alta endemicidade e à morbidade.

Em todas as formas clínicas da LTA, a ativação da resposta imune é dependente de células T e de maneira geral, se aceita que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* esteja relacionada ao balanço entre as células Th1 e Th2 (Pirmez et al 1993, Bacellar et al 2002). No entanto, acredita-se que além da dicotomia Th1/Th2, mecanismos imunomodulatórios estejam presentes e sejam importantes para a evolução clínica dos pacientes.

Sabe-se que a interação peptídeo-MHC induz uma cascata de sinalização intracelular que pode culminar na ativação de fatores transcricionais. Estes fatores regulam a expressão de genes relacionados à produção de moléculas envolvidas na resposta imune, como as citocinas. Os fatores transcricionais T-bet, GATA-3 e Foxp3 têm sido implicados na indução respectivamente de citocinas do tipo 1, tipo 2 e reguladoras. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel destes fatores na imunopatogênese e no controle da infecção por *Leishmania*, sobretudo em humanos.

O estudo de fatores transcricionais e citocinas associadas a um perfil pró/antiinflamatório e regulador poderão contribuir para a identificação de parâmetros que estejam associados à manutenção da cura clínica e ao controle da infecção na LTA. Além disso, este estudo poderá trazer novas informações para o desenvolvimento de vacinas e de resposta à terapêutica na LTA.

Objetivo geral

O objetivo do projeto é avaliar se os níveis de expressão gênica de citocinas e fatores transcricionais envolvidos na patogênese e controle da leishmaniose tegumentar americana apresentam modificações durante os diferentes períodos de cura clínica.

Objetivos específicos

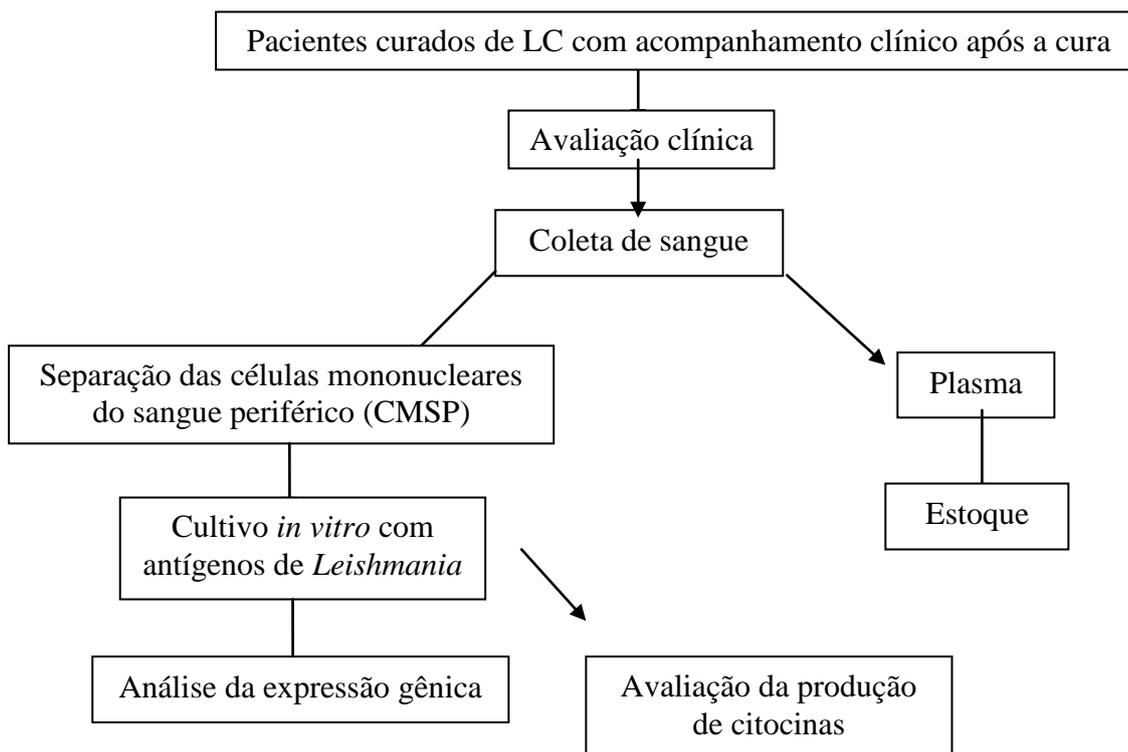
- A) Avaliar em pacientes de leishmaniose cutânea curados clinicamente se a indução dos genes *TBET* e *GATA3* frente a antígenos de *Leishmania* está associada à expressão de citocinas ao perfil tipo 1 (*IFNG*, *IL12A*, *IL18*) e tipo 2 (*IL4* e *IL5*), respectivamente.
- B) Determinar se fator transcricional *FOXP3* está associado à expressão do gene de *IL10*, ambos envolvidos com a resposta regulatória na cura LTA, em pacientes curados.
- C) Identificar se a expressão de fatores transcricionais e citocinas em casos de leishmaniose cutânea que evoluíram para a cura espontânea difere daqueles que curaram através da intervenção terapêutica.
- D) Analisar se o tempo de cura influencia na expressão de fatores transcricionais e citocinas associados ao perfil de resposta imune tipo 1, tipo 2 e regulador.

2. Material e Métodos

2.1 Estratégia e desenho experimental

Para identificar alterações na expressão de genes associados com resposta imune, foram realizados ensaios *in vitro* com células mononucleares do sangue periférico (CMSP) estimuladas com antígenos de *L. braziliensis* (Ag-Lb) de amostras de pacientes em diferentes períodos pós-cura clínica e de indivíduos saudáveis. Após o cultivo, foram extraídos os RNAs das amostras para avaliação da expressão gênica de citocinas e fatores transcricionais através da técnica de PCR em tempo real. Os sobrenadantes provenientes das culturas foram estocados para posterior análise da produção de citocinas.

O desenho experimental pode ser observado no esquema abaixo:



2.2 Casuística

Foram estudados pacientes curados de LTA em acompanhamento ambulatorial na unidade de saúde Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

Os indivíduos que concordaram em participar deste projeto assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, redigido de acordo com as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, MS. Os pacientes foram divididos nos seguintes grupos:

(I) Indivíduos com história de tratamento para leishmaniose cutânea e considerados clinicamente curados há menos de dois anos (LCC<2a; n=11);

(II) Indivíduos com história de tratamento para leishmaniose cutânea e considerados clinicamente curados há mais de 02 anos (LCC>2a; n=10);

(III) Indivíduos que curaram espontaneamente (CE; n=5);

(IV) Indivíduos sadios (IS; n=08).

Os prontuários dos pacientes foram analisados quanto a informações epidemiológicas (procedência e dados demográficos) e clínicas (tempo de evolução, tempo de cura, dados diagnósticos de leishmaniose, resposta ao tratamento, reativação e re-infecção) dos participantes da pesquisa.

O tratamento foi considerado insatisfatório quando somente com o uso do glucantime, houve ausência de cicatrização completa, sendo então necessária a utilização de outro esquema terapêutico adicional ou a repetição de mais um ciclo do glucantime. O tempo de cura foi calculado como o intervalo de tempo existente entre a data do término do tratamento e a data da avaliação atual.

Os indivíduos deste estudo foram acompanhados clinicamente desde a doença ativa, até após o término do tratamento e a cada 12 meses (durante cinco anos), ou quando ocorrerem intercorrências clínicas. Já os voluntários sadios foram avaliados através da resposta proliferativa de linfócitos (RPL) frente a antígeno de *L. braziliensis*, onde aqueles que apresentaram um índice de estimulação igual ou superior a 2,5 foram eliminados do estudo. O desenho experimental de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)-FIOCRUZ protocolo 206/03 e está associado ao projeto “Caracterização de linfócitos T reativos à *Leishmania* associados à proteção e à resposta

imune duradoura na leishmaniose tegumentar americana” aprovado pelo CEP-IPEC protocolo 069/2008.

2.3 Obtenção de material biológico para os ensaios laboratoriais

No momento de admissão do protocolo foi coletado de cada indivíduo um volume máximo de 30 mL de sangue periférico em tubos com heparina. O plasma proveniente desta coleta foi aliquoteado e estocado a -20°C para a realização da detecção de citocinas. Do sangue heparinizado foram obtidas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) utilizadas para ensaios *in vitro* de quantificação da transcrição gênica para citocinas e fatores transcricionais por PCR em tempo real. Os sobrenadantes de cultura foram estocados para serem analisados posteriormente por ensaios de Luminex.

2.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

O sangue heparinizado foi diluído na proporção 1:1 com RPMI 1640 suplementado com 2-mercaptoetanol (10mM), L-glutamina (1,5mM), antibiótico (200 UI de penicilina e 200µg/mL de estreptomicina), ambos adquiridos da Sigma (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA). As CMSP foram obtidas por intermédio do gradiente Ficoll-Hypaque (Histopaque - 1119, Sigma, EUA) na proporção 1:2 a 1000 g por 20 min (Thermo Fischer Scientific Inc., Massachusetts, EUA). Ao final da centrifugação, o tubo apresentou um anel de CMSP que foi coletado por intermédio de uma pipeta Pasteur (Chase Instruments Corp, Tennessee, EUA). Em seguida, as CMSP foram lavadas com meio RPMI três vezes por centrifugação a 670 g, 10 min à 4°C. A quantidade de células viáveis foi determinada através da contagem utilizando o Azul de Tripán (Sigma, EUA) em câmara de Neubauer em aumento de 40x em microscópio óptico (Carl Zeiss MicroImaging Inc., Thornwood, NY, EUA) e essas foram ajustadas para a concentração de 3×10^6 células por mL em meio RPMI (Sigma, EUA) suplementado e acrescido de 10% soro humano inativado do tipo AB (Sigma, EUA). O plasma obtido foi estocado a -20°C.

2.5 Preparação de antígenos de promastigotas de *Leishmania braziliensis* para os ensaios de avaliação de resposta imune.

Para a obtenção do antígeno a ser utilizado nos experimentos de cultivo *in vitro* foram utilizadas formas promastigotas da cepa de referência de *L. braziliensis* (Ag-Lb) (MHOM/BR/75/M2903). As leishmânias foram expandidas em frascos de poliestireno de 25cm² contendo meio de cultura Schneider (pH 7,2, “Schneider’s insect medium”, Sigma, EUA) suplementado com 1,5 mM de L-glutamina (Sigma), 10 mM de HEPES (Sigma), antibióticos (200 UI de penicilina e 200µg/mL de estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (Sigma, EUA).

Primeiramente foi verificado o tempo ideal de cultivo para a preparação do antígeno (fase estacionária) por intermédio da curva de crescimento da *Leishmania*. Após cinco dias, a cultura foi centrifugada a 1900 g, 4°C, 15 min, e o precipitado foi lavado com solução salina fosfatada (PBS, pH 7,2). Novamente a cultura foi centrifugada a 1900 g, 4°C por 15 min, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspenso em PBS para a contagem do número de leishmânias. Essa contagem foi realizada a fim de que pudéssemos relacionar o número de promastigotas com a concentração de proteínas. A seguir, a suspensão foi submetida a 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C em banho maria, a fim de se obter o antígeno particulado. A lise completa foi confirmada pela ausência de parasitos íntegros na visualização no microscópio óptico. A dosagem de proteína dos antígenos parasitários foi realizada pelo Método de Lowry e a concentração protéica foi ajustada para 1mg/mL (equivalente a 10⁸ promastigotas/ml em PBS). O antígeno, assim preparado, foi alíquotado e conservado a -70°C até o momento de uso.

2.6 Ensaio de resposta proliferativa de linfócitos (RPL) a partir de células mononucleares do sangue periférico (CMSP).

As culturas celulares (3x10⁵ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços (Corning Incorporated, NY, EUA-fundo U) em triplicata nas seguintes condições: células sem estímulo (controle), células estimuladas com Concanavalina-A (1µg/poço), células com antígeno total de *L. braziliensis* (10µg/poço). O volume final do poço foi ajustado para 200µl, com meio RPMI 1640 (Sigma, EUA) completo

acrescido de 10% de soro AB humano inativado (Sigma, EUA). Em seguida, essas placas foram incubadas por cinco dias em uma estufa de CO₂ a 5%, 37°C (General Electric, GE, São Paulo, Brasil). Dezesesseis horas antes do término do período de incubação, foi adicionado 1μCi de timidina tritiada por poço (Amersham International, Amersham, Reino Unido), a fim de que esta se incorporasse no DNA das células e a resposta celular proliferativa frente ao antígeno e ao mitógeno pudesse ser quantificada. As células foram então recolhidas em papel de filtro (Titertektm, Flow Laboratories, Rockville, Md, EUA), utilizando um multicoletor de células (Cell Harvester, Skatron Instruments AS, Flow Laboratories, Rockville, Md, EUA). A intensidade de incorporação da timidina foi medida em um contador de emissão beta (TRI-CARB® Liquid Scintillator Analyser, Packard Instrument Company, Downers Grove, IL, EUA). Os resultados da proliferação celular foram expressos por contagem por minuto (cpm) e índice de estimulação (IE; média dos poços com estímulo sobre média dos poços sem estímulo), no qual foram considerados positivos os índices de estimulação igual ou superior a 2,5.

2.7 Quantificação de cópias de RNA mensageiro para citocinas e fatores de transcrição por PCR em tempo real

2.7.1 Extração do RNA de células mantidas em cultivo *in vitro*.

Após o ajuste das células para a concentração de 3 x 10⁶ por mL, as mesmas foram cultivadas em placa de 24 poços (BD - Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) e incubadas em estufa com 5% de CO₂, 37°C (General Electric, GE, São Paulo, Brasil). As culturas foram realizadas nas seguintes condições de estímulo: células sem estímulo (controle) e células estimuladas com *L. braziliensis* (50μl/poço). Após o período estabelecido, as células foram coletadas dos poços em tubos Eppendorf livre de RNase (Axygen Scientific, Califórnia, EUA), e foram centrifugadas a 670 g, 07 min, 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado para posterior análise de produção de citocinas e armazenado a -20°C. As células foram ressuspensas em RNA *later* (Qiagen, Duesseldorf, Alemanha), e armazenadas a -70°C até o momento do processamento.

Com o objetivo de definir o período adequado para a avaliação dos genes de interesse, foi realizado um ensaio de cinética, onde as células foram colocadas na presença ou ausência do Ag-Lb em diferentes tempos de cultura: 12, 24, 48 e 72 horas.

Neste ensaio foi observado que a partir do período de 24 horas, a maioria das citocinas e fatores transcricionais avaliados passaram a apresentar um padrão mais estável nas suas expressões. Visto a quantidade de citocinas e fatores transcricionais analisados de uma única vez pelo sistema escolhido, e que o nosso grupo já apresentava material estocado com este tempo de cultivo, o período estabelecido para avaliação da expressão gênica foi de 72 horas.

O RNA total foi extraído através do RNeasy Mini Kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany). Inicialmente foram adicionados às amostras 350 µL de tampão de lise (fornecido pelo kit), e estas foram homogeneizadas por 40 segundos em um agitador em vórtice. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas por 03 minutos a 14.000 x g, e o sobrenadante (lisado) resultante desta centrifugação foi removido e transferido para um novo tubo (fornecido pelo kit). Foram adicionados então 600 µL de etanol 70% sobre o lisado. Posteriormente, a amostra foi transferida para a coluna RNeasy *spin* (fornecida pelo kit), para então ser centrifugada por 15 segundos a 14.000 x g. Para eliminar a contaminação do DNA genômico, a coluna foi tratada com enzima DNase (20U/DNase) (Promega Corporation, Wisconsin, EUA) e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foi aplicado 350 µL de tampão de lavagem W1 (fornecido pelo kit) sobre a coluna. Esta foi centrifugada por 15 segundos a 14.000 x g. Foi adicionado então 500 µL de tampão RPE (fornecido pelo kit) sobre a coluna. A mesma foi centrifugada por 15 segundos a 14.000 x g, e este procedimento foi repetido por duas vezes. O tubo coletor foi descartado e a membrana foi acoplada a um tubo tipo Eppendorf RNase free (Axygen Biosciences, CA, EUA) e então centrifugada por 03 minutos a 14.000 x g para secagem do filtro. A seguir, foi adicionado 40 µl de água livre de RNase pré-aquecida a 65°C sobre a coluna e após três minutos, o tubo foi centrifugado a 14.000 x g a fim de que RNA fosse eluído.

Após o procedimento descrito acima, o RNA foi quantificado pelo Nanodrop (ND 1000 Uniscience, São Paulo, Brasil) e as amostras foram normalizadas com o intuito de apresentarem ao final uma concentração de 10 nanogramas (ng). Um gel de agarose 1,2% foi confeccionado para avaliar a integridade do RNA tendo como alvo as subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal (RNAr). Devido à quantidade escassa de RNA obtida pelo método, o gel foi realizado com quatro amostras teste selecionadas aleatoriamente entre os quatro grupos avaliados.

2.7.2 Síntese de cDNA a partir do RNA extraído das células mantidas em cultivo *in vitro*.

Após a comprovação da integridade do RNA extraído, foi realizado a síntese do cDNA pela transcriptase reversa (RT-PCR, do inglês *reverse transcriptase*), onde 02 µL de iniciadores randômicos foram adicionados à amostra. Esta foi então aquecida a 70°C por 10 minutos e então resfriada imediatamente para que ocorresse o anelamento e evitar a re-conformação do RNA em estruturas secundárias. Após o resfriamento, foi adicionado à amostra 04µL de tampão cinco vezes concentrado, 02µL de 0,1M DTT, 01µL de 10mM dNTP e 01µL da enzima RT. A amostra foi então incubada por 01 hora e 30 minutos a 44°C, e posteriormente foi estocada a -20°C. Para este procedimento foram utilizados reagentes da Invitrogen (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA).

2.7.3 Definição das sequências iniciadoras da amplificação dos genes de citocinas e fatores transcricionais de interesse.

A avaliação do perfil de citocinas foi realizado com base na expressão gênica das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-12A, IL-4, IL-5, IL-18, dos fatores transcricionais T-bet, GATA-3, FOXP3 e dos genes constitutivos gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), fator 1 alfa do alongamento eucariótico (*EEF1A1*), Ubiquitina (*UBIQUITIN*) e Ciclofilina A (*PPIA1*). As análises foram realizadas no sistema de detecção de seqüências ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA). A metodologia escolhida para avaliação destas citocinas foi o PCR em tempo real (Sistema Taqman – Applied Biosystems, Foster, CA, EUA)

Após a síntese do cDNA, a quantificação das seqüências foi realizada utilizando-se os seguintes iniciadores:

Quadro 1 : Descrição e identificação das seqüências dos iniciadores e das sondas dos genes alvos.

CITOCINAS E FATORES TRANSCRICIONAIS ALVOS	
<i>IFNG</i>	Senso: 5' -CCAACGCAAAGCAATACATGA - 3' Anti-senso: 5' -TTTTCGCTTCCCTGTTTTAGCT - 3' Sonda: 5`FAM-TCCAAGTGATGGCTGAACTGTCGCC-BHQ
<i>IL10</i>	Senso: 5' -TGAGAACAGCTGCACCCACTT - 3' Anti-senso: 5' - GCTGAAGGCATCTCGGAGAT -3' Sonda: 5`FAM- CAGGCAACCTGCCTAACATGCTTCG-BHQ
<i>IL12A</i>	Senso: 5' - TCCTCCTGGACCACCTCAGT - 3' Anti-senso: 5' - GAACATTCCCTGGGTCTGGAGTG - 3' Sonda: 5`FAM- TGGCCAGAAACCTCCCCGTGG -BHQ
<i>IL4</i>	Senso : 5' - GCTTCCCCCTCTGTTCTTCCT - 3' Anti-senso: 5' - GCTCTGTGAGGCTGTTCAAAGTT - 3' Sonda: 5`FAM-TCCACGGACACAAGTGCGATATCACC-BHQ
<i>IL5</i>	Senso: 5' - AGCTGCCTACGTGTATGCCA - 3' Anti-senso: 5' - GTGCCAAGGTCTCTTTCACCA - 3' Sonda: 5`FAM- CCCACAGAAATTCCCACAAGTGCA-BHQ
<i>IL18</i>	Senso: 5' - GCTGAGGCAGGAGAATCACTTG - 3' Anti-senso: 5' - GAGCGCAATGGTGCAATCT - 3' Sonda: 5`FAM- TCCGGAGGTAGAGGTTGTGGTGAGCC -BHQ
<i>TBET</i>	Senso: 5' - CAACACGCATATCTTTACTTTCCAA - 3' Anti-senso: 5' - AGCTGAGTAATCTCGGCATTCTG - 3' Sonda: 5`FAM-CCCAGTTCATTGCCGTGACTGCC-BHQ
<i>GATA3</i>	Senso: 5' - AGCCTGTCCTTTGGACCACA - 3' Anti-senso: 5' - CATCGAGCAGGGCTCTAACC - 3' Sonda: 5`FAM-CACCCCTCCAGCATGGTCACCG-BHQ
<i>FOXP3</i>	Senso: 5' - TGCCAGGCGGACCATCT - 3' Anti-senso: 5' - GCTGCTCCAGAGACTGTACCATCT - 3' Sonda: 5`FAM-CTGGATGAGAAGGGCAGGGCACA-BHQ
GENES CONSTITUTIVOS	
<i>GAPDH(2)</i>	Senso: 5' - AGAAAAACCTGCCAAATATGATGAC - 3' Anti-senso: 5' - GCCCAGGATGCCCTTGA - 3' Sonda: 5`FAM- AAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGA -BHQ
<i>EEF1A1</i>	Senso: 5' - CCTTGGTTCAAGGGATGGAA - 3' Anti-senso: 5' - GCCTCAAGCAGCGTGGTT - 3' Sonda: 5`FAM- CACTGGCATTGCCATCCTTACGGG-BHQ
<i>Ubiquitin</i>	Senso: 5' - GGGCGGTTGGCTTTGTT - 3' Anti-senso: 3' - TGCCAATCACCAACCACGT - 3' Sonda: 5`FAM- TGAGCTTGTTTGTGTCCCTGTGGGTG -BHQ
<i>PPIA</i>	Senso: 5' - ACGGGTCTGGCATCTTGT - 3' Anti-senso: 5' - GCAGATGAAAACTGGGAACCA - 3' Sonda: 5`FAM- ATGGCAAATGCTGGACCCAACACA -BHQ

2.7.4 Amplificação das seqüências gênica reconhecidas por PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi realizada em um sistema de placas de 96 poços (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA), onde cada poço continha iniciadores Taqman e sondas liofilizadas para a detecção de um gene alvo nas concentrações ótima determinadas em estudos piloto. Estas placas foram elaboradas e gentilmente cedidas pelo Dr. Silvio Favoreto Júnior, do Laboratório de Allergy and Immunology, Northwestern University, Chicago, IL. O PCR-TR foi realizado num volume máximo de 25µL composto de 2X concentrado de Taqman Mater Mix (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA) e 5nM de cada iniciador senso e anti-senso e 300nM de cada sonda. O cDNA foi amplificado em 50 ciclos com temperaturas de 50°C por 2 minutos para ativação da enzima (Amplitaq), 95°C por 10 minutos para a desnaturação inicial, 95°C por 15 segundos para desnaturação em cada ciclo da reação e 60°C por 01 minuto para anelamento. Todos os iniciadores foram desenhados para apresentar a mesma temperatura de anelamento e eficiência de reação. A eficiência de cada grupo de iniciadores e sondas foi medida pelo método de *slope* em uma reação utilizando RNA universal, como descrito em A-Z of Quantitative PCR, IUL Biotenchnology Series, Stephen A. Bustin. Todos os iniciadores utilizados nesse protocolo têm eficiência comprovada entre 95 e 100% e foram sintetizados por Biosearch Technologies (Novato, CA, EUA).

A amplificação dos produtos gênicos foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, supervisionado pela Dra. Constança Britto e Maria Angélica Cardoso através do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde (PDTIS).

2.8 Cálculo dos resultados

Os resultados foram calculados pela fórmula de quantificação, usando o método comparativo de Ct (*threshold cycle*), que significa o ciclo de amplificação onde é detectado um aumento da fluorescência acima do sinal basal. Em seguida, o valor de Ct foi convertido em número de cópias de genes (NCG) pela fórmula $NCG = -0.283 \times Ct + 11.309$, conforme descrito por Dolganov e colaboradores (Dolganov et al 2001). Desta forma, todos os Cts do PCR foram transformados linearmente através da referida equação. Foi utilizado ainda um programa denominado GENORM (Vandesompele et al

2002) a fim de se encontrar os genes constitutivos mais estáveis a serem empregados na normalização dos dados. Em seguida, foi calculado o fator de normalização a partir da média geométrica de dois genes constitutivos mais estáveis apontados pelo programa. Baseado nisso, a normalização dos dados foi efetuada através da razão NCG / fator de normalização.

2.9 Análise estatística

Os dados obtidos no trabalho tiveram sua distribuição testada para normalidade através do método de Kolmogorov-Smirnov. Para as distribuições normais empregou-se o teste t de Student não pareado com ou sem a correção de Welch. Para as distribuições não-normais foi empregado o teste Mann-Whitney (não-paramétrico, *two tail*). As análises de correlação foram realizadas utilizando o teste de Correlação de Spearman. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Instat, GraphPad Software, San Diego, EUA). Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes de leishmaniose cutânea curados clinicamente.

Foram avaliados um total de 26 pacientes curados de LC, sendo 11 pacientes LCC<2a, 10 pacientes LCC>2a e cinco pacientes que evoluíram com cura espontânea. Nenhum dos pacientes apresentou histórico de reativação da doença e/ou comprometimento mucoso. As principais características clínicas e epidemiológicas estão descritas na **Tabela 1**.

O grupo dos pacientes curados clinicamente de leishmaniose tegumentar foi composto de 12 homens e 14 mulheres com idade média de $38,8 \pm 17$ anos (mediana = 38,5 anos). A maioria dos pacientes residia em Campo Grande/RJ (26,9%). O tempo de evolução mais freqüente foi de 60 dias, representando 46,7% da população total estudada.

O tratamento mais utilizado foi o de glucantime (dados não mostrados), e 88,2% deles apresentaram resposta satisfatória ao tratamento. Somente em dois pacientes foi observada uma resposta insatisfatória, visto que ao final do tratamento não houve a cicatrização total da lesão, sendo necessárias intervenções adicionais como aplicação intralesional de glucantime em um caso, e a prescrição de pentamidina associada com glucantime no outro caso.

O tempo de cura clínica médio entre a alta ambulatorial e o momento de coleta de material biológico para estudo do grupo dos LCC<2a foi de $15,9 \pm 6,1$ meses (mediana=18 meses). Os pacientes LCC>2a foram estudados com tempo de cura médio de $71,8 \pm 80,7$ meses (mediana=43 meses) e o do grupo dos CE este período foi de $156 \pm 82,7$ meses (mediana=132 meses).

O grupo controle foi composto por oito voluntários sadios que não eram moradores de área endêmica, sem histórico prévio de leishmaniose e cujas CMSP não apresentaram reatividade aos antígenos de *Leishmania*. Este grupo foi formado por quatro homens e quatro mulheres, com idade média de $26,3 \pm 5,7$ anos (mediana=25anos).

Tabela 1: Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes clinicamente curados de leishmaniose cutânea (LCC) após intervenção terapêutica e por cura espontânea (CE).*

Características	Frequência (n)	Percentual (%)
<u>Sexo</u>		
Masculino	12 (26)	46,2%
Feminino	14 (26)	53,8%
<u>Tempo de evolução</u>		
30 dias	06 (21)	28,6
45 dias	01 (21)	4,8
60 dias	09 (21)	42,8
90 dias	01 (21)	4,8
120 dias	03 (21)	14,2
180 dias	01 (21)	4,8
<u>Número de lesões</u>		
1 lesão	14 (21)	66,6
2 lesões	03 (21)	14,3
3 lesões	02 (21)	9,5
4 lesões	01 (21)	4,8
mais de 4 lesões	01 (21)	4,8
<u>Resposta ao tratamento</u>		
Satisfatória	15 (17)	88,2
Insatisfatória	02 (17)	11,8
<u>Tempo de cura</u>		
<u>LCC</u>		
03 – 12 meses	04 (21)	19
13 – 24 meses	08 (21)	38,1
25 – 36 meses	03 (21)	14,3
mais de 36 meses	06 (21)	28,6
<u>CE</u>		
36 – 48 meses	0 (05)	0
49 – 60 meses	0 (05)	0
mais de 60 meses	05 (05)	100

LCC – Leishmaniose cutânea clinicamente curada; LCC<2a - Leishmaniose cutânea clinicamente curada há menos de dois anos; LCC>2a - Leishmaniose cutânea curada há mais de dois anos; CE - Cura espontânea; F - feminino; M - masculino; (n) – número de casos avaliados. * Os dados clínicos tempo de evolução, número de lesões e resposta ao tratamento não foram avaliados para o grupo dos CE.

3.2 A resposta proliferativa de linfócitos frente aos antígenos de *Leishmania braziliensis* em pacientes curados de leishmaniose cutânea e indivíduos sadios.

Com o objetivo de avaliar a capacidade das células proliferarem frente a antígenos de *Leishmania*, realizou-se o ensaio de resposta proliferativa de linfócitos (RPL-Lb), no qual as respostas que apresentaram índice de estimulação (IE) igual ou superior a 2,5 foram consideradas positivas.

Todos os indivíduos controle (voluntários sadios) apresentaram uma RPL-Lb com IE abaixo de 2,5 ($1,6 \pm 0,5$; mediana=1,8) (dados não mostrados). Embora a mediana do IE da RPL-Lb dos casos clinicamente curados há menos de dois anos ($IE=14,9 \pm 9,3$; mediana= 11,7; n=10) fosse inferior ao observado no grupo curado há mais de dois anos ($IE=22,9 \pm 27,1$; mediana= 10; n=9), esse dado não apresentou significância estatística. Além disso, foi observado que tanto nos LCC<2a como nos LCC>2a existem grupos de pacientes com IE muito baixo ou muito elevado, formando assim dois grupos: aqueles que contêm linfócitos como uma baixa capacidade de responder ao antígeno de *Leishmania* e aqueles que apresentam uma alta capacidade de responder a este antígeno (**Figura 3**).

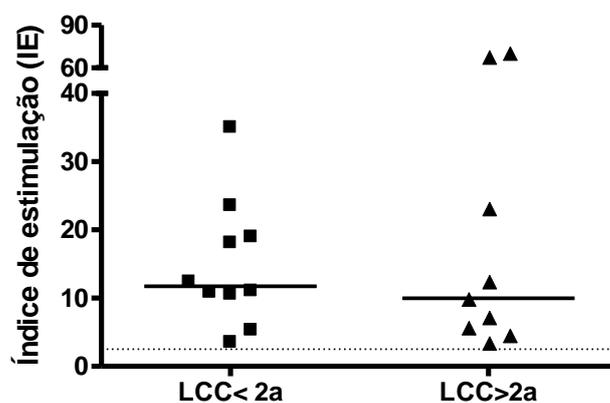


Figura 3: Índice de estimulação (IE) da resposta proliferativa de linfócitos (RPL) em pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC), após o estímulo *in vitro* com antígenos de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb). Os pacientes foram divididos em dois grupos: menos de dois anos após a cura clínica (LCC<2a, n=10) e mais de dois anos após a cura clínica (LCC>2a, n=09). Os resultados foram expressos como índice de estimulação (IE) e a mediana foi representada por barras horizontais. Cada ponto representa um indivíduo e a linha tracejada indica o valor de corte para positividade (IE > 2,5).

3.3 Análises da integridade do RNA obtido das células mononucleares do sangue periférico.

Para analisar a qualidade do RNA extraído das CMSP, este foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2%. As amostras foram consideradas adequadas quando as bandas 18S e 28S se mostraram íntegras, e quando nenhum traço de DNA genômico foi detectado. Quatro amostras teste foram selecionadas aleatoriamente para serem utilizadas no gel. (Figura 4).

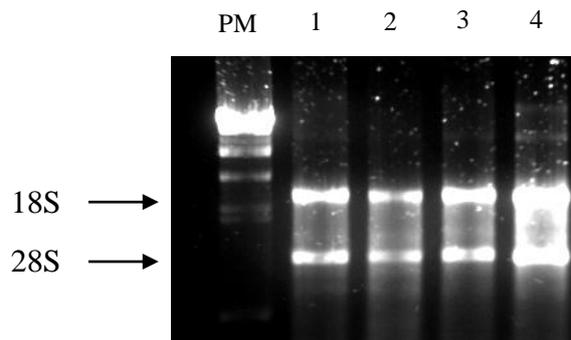


Figura 4: Avaliação da qualidade e integridade das amostras de RNA. O RNA extraído de células mononucleares do sangue periférico estimuladas *in vitro* com antígenos de *Leishmania braziliensis* foi submetido à corrida por eletroforese em gel de agarose. Um total de 0,5-1,0µg de RNA foi carregado em gel de agarose 1,2% conforme descrito anteriormente na metodologia. Amostras de RNA: numeração de 1 a 4 corresponde a amostras de pacientes LCC. PM: peso molecular.

3.4 Detecção da expressão gênica de citocinas e fatores transcricionais em células mononucleares do sangue periférico provenientes de indivíduos curados de leishmaniose

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) provenientes de indivíduos curados foram colocadas em cultivo *in vitro*, na ausência ou presença dos antígenos de *Leishmania*, e foi quantificada a expressão gênica dos fatores transcricionais T-bet, GATA-3 e Foxp3 e das citocinas IFN- γ , IL-12A, IL-18, IL-4, IL-5 e IL-10 pela técnica de PCR em tempo real.

3.4.1 Expressão gênica de *TBET*, *IFNG*, *IL12A* e *IL18* e em células estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis* nos pacientes curados clinicamente e nos indivíduos saudáveis.

A análise da expressão de *TBET* em células estimuladas com Ag-Lb, não demonstrou diferença significativa entre os grupos LCC<2a ($1,2 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $0,6 \times 10^6$ cópias de RNA, n= 08) e LCC>2a ($0,7 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $0,5 \times 10^6$ cópias de RNA, n=07). A expressão observada deste gene em indivíduos saudáveis (IS) ($5,1 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $4,4 \times 10^6$ cópias de RNA, n=06) foi semelhante à observada nos indivíduos LCC, independente do tempo de cura. Entretanto, foi encontrada uma maior expressão deste fator transcricional no grupo CE ($2,4 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $2,6 \times 10^6$ cópias de RNA, n=04), quando comparada ao grupo de LCC>2a ($p < 0,05$) e aos IS ($p < 0,01$) (**Figura 5A**).

Resultados semelhantes aos descritos acima, foram encontrados quando se avaliou a expressão do *IFNG*. Os grupos LCC<2a ($6,7 \times 10^6 \pm 6,3 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $6,1 \times 10^6$ cópias de RNA, n=10), LCC>2a ($5,6 \times 10^6 \pm 5,9 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $3,7 \times 10^6$ cópias de RNA, n=09) e IS ($2,8 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $2,8 \times 10^6$ cópias de RNA, n=08) apresentaram expressão similar do gene que codifica para esta citocina. Contudo, como observado em *TBET*, a expressão de *IFNG* no grupo dos CE ($15 \times 10^6 \pm 7,3 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= 16×10^6 cópias de RNA, n=05) foi significativamente maior quando comparada com o LCC>2a ($p < 0,05$) e aos IS ($p < 0,01$) (**Figura 5B**).

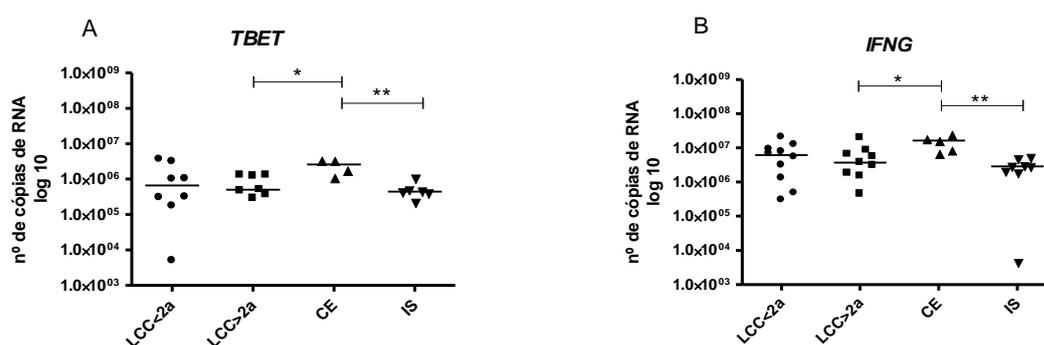


Figura 5: Expressão do fator transcricional *TBET* e do *IFNG* em células mononucleares de pacientes de leishmaniose. Foram estudados pacientes de leishmaniose cutânea curada há menos de dois anos (LCC<2a), leishmaniose cutânea cura há mais de dois anos (LCC>2a), cura espontânea (CE) e indivíduos saudáveis (IS). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram ativadas *in vitro* por antígenos de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb). O RNA foi extraído, e os transcritos específicos foram quantificados por PCR em tempo real. **A:** Número de cópias de RNAm de *TBET* em amostras de células de pacientes LCC<2a (n=08), LCC>2a (n=07), CE (n=04) e IS (n=06), **B:** Número de cópias de RNAm de *IFNG* em amostras de células de pacientes LCC<2a (n=10), LCC>2a (n=09), CE (n=05) e IS (n=08).

Cada ponto representa um indivíduo. Medianas são representadas por linhas horizontais. N: número; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Valor do p obtido pelo teste t não-paramétrico de Mann-Whitney.

Também foi avaliada a expressão gênica da subunidade p35 presente na citocina IL-12 (IL-12A), visto que a mesma é uma importante sinalizadora na indução da produção de citocinas de perfil tipo 1.

Em relação à expressão de *IL12A* em células estimuladas com Ag-Lb foi observada uma maior expressão no grupo LCC<2a ($8,1 \times 10^6 \pm 6,3 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $6,5 \times 10^6$ cópias de RNA, n=09) quando comparada com o grupo LCC>2a ($2,2 \times 10^6 \pm 3,1 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $0,7 \times 10^6$ cópias de RNA, n=09, $p < 0,01$) e IS ($1,1 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $1,3 \times 10^6$ cópias de RNA, n=07, $p < 0,001$). Além disso, de maneira similar foi observado que o grupo CE ($9,7 \times 10^6 \pm 7,2 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $7,2 \times 10^6$ cópias de RNA, n=05) apresentou maior expressão de *IL12A* quando comparado com o grupo LCC>2a ($p < 0,05$) e IS ($p < 0,05$) (**Figura 6A**).

Para complementar o entendimento da alça de produção de citocinas do tipo 1, foi avaliada a expressão gênica da *IL18*, que atua de maneira sinérgica com a IL-12. Os resultados demonstraram que o grupo LCC<2a ($12,3 \times 10^6 \pm 5,4 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= 13×10^6 cópias de RNA, n=08) apresentou uma tendência em expressar uma maior quantidade desta citocina quando comparado com o LCC>2a ($2,9 \times 10^6 \pm 6,3 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $0,4 \times 10^6$ cópias de RNA, n=07, $p = 0,07$). Além disso, foi encontrada diferença significativa entre LCC<2a e o grupo dos IS ($0,4 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $0,2 \times 10^6$ cópias de RNA, n=07) (**Figura 6B**).

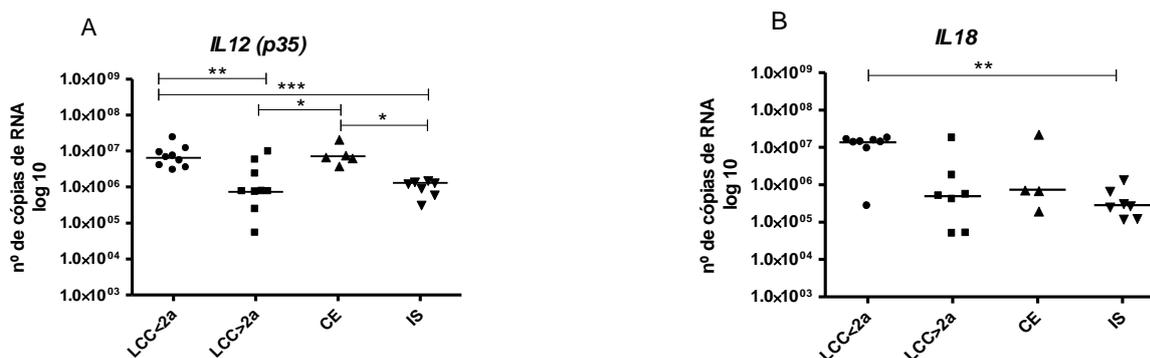


Figura 6: Expressão da subunidade p35 da citocina IL-12 (*IL12A*) e da *IL18* em células mononucleares de pacientes de leishmaniose. Foram estudados pacientes de leishmaniose cutânea curada há menos de dois anos (LCC<2a), leishmaniose cutânea cura há mais de dois anos (LCC>2a), cura espontânea (CE) e indivíduos saudáveis (IS). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram ativadas *in vitro* por antígenos de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb). O RNA foi extraído, e os transcritos específicos foram quantificados por PCR em tempo real. **A:** Número de cópias de RNAm de *IL12A* em amostras de células de pacientes LCC<2a (n=09), LCC>2a (n=09), CE (n=05) e IS (n=07). **B:** Número de cópias de RNAm de *IL18* em amostras de células de pacientes LCC<2a (n=08), LCC>2a (n=07), CE (n=04) e IS (n=07). Cada ponto representa um indivíduo. Medianas são representadas por linhas horizontais. N: número; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Valor do p obtido pelo teste t não-paramétrico de Mann-Whitney.

3.4.2 Expressão gênica de *GATA3*, *IL4* e *IL5* em células estimuladas com antígenos de *Leishmania braziliensis* nos pacientes curados clinicamente e nos indivíduos saudáveis

Após observar as diferenças na expressão gênica de mediadores que participam de um ambiente imunológico do tipo 1, passou-se a avaliar também a expressão de fatores e citocinas relacionados ao perfil do tipo 2.

A análise da expressão de *GATA3* em CMSP estimuladas com Ag-Lb nos diferentes grupos demonstrou que o grupo CE ($19 \times 10^6 \pm 10 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= 16×10^6 cópias de RNA, n=05) apresentou elevada expressão de *GATA3* quando comparada com o grupo LCC<2a ($1,0 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $0,7 \times 10^6$ cópias de RNA, n=10, $p<0,001$), LCC>2a ($11 \times 10^6 \pm 28 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= 19×10^6 cópias de RNA, n=09, $p<0,05$) e IS ($3,3 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $3,2 \times 10^6$ cópias de RNA, n=05, $p<0,01$). Além disso, o grupo dos IS exibiu maior expressão de *GATA3* quando comparado com os pacientes LCC<2a ($p<0,01$) (Figura 7).

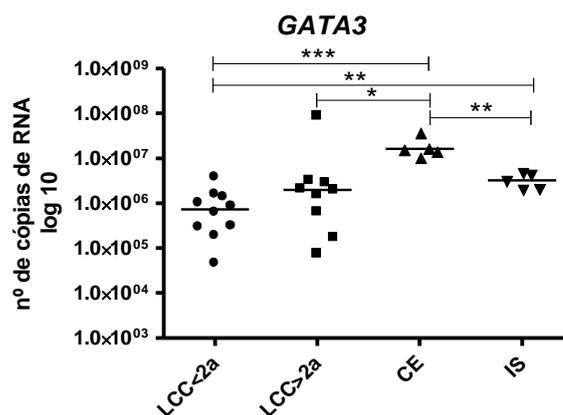


Figura 7: Expressão do fator transcricional *GATA3* em células mononucleares de pacientes de leishmaniose. Foram estudados pacientes de leishmaniose cutânea curada há menos de dois anos (LCC<2a), leishmaniose cutânea cura há mais de dois anos (LCC>2a), cura espontânea (CE) e indivíduos saudáveis (IS). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram ativadas *in vitro* por antígenos de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb). O RNA foi extraído, e o transcrito específico foi quantificado por PCR em tempo real. Número de cópias de RNAm de *GATA3* em amostras de células de pacientes LCC<2a (n=10), LCC>2a (n=09), CE (n=05) e IS (n=05). Cada ponto representa um indivíduo. Medianas são representadas por linhas horizontais. N: número; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Valor do p obtido pelo teste t não-paramétrico de Mann-Whitney.

Em relação à expressão gênica de *IL4*, os resultados demonstraram que o grupo LCC<2a ($4,6 \times 10^6 \pm 3,3 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $3,1 \times 10^6$ cópias de RNA, n=11) apresentou redução significativa na expressão de *IL4* quando comparado aos IS ($1,2 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $1,1 \times 10^6$ cópias de RNA, n=08, $p<0,05$). Além disso, o grupo dos CE ($10 \times 10^6 \pm 6,5 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $9,0 \times 10^6$ cópias de RNA, n=05), apresentou maior expressão desta molécula quando comparado ao LCC>2a ($8,4 \times 10^6 \pm 2,0 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $1,0 \times 10^6$ cópias de RNA, n=09, $p<0,05$) e IS ($1,2 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $1,1 \times 10^6$ cópias de RNA, n=08, $p<0,01$) (**Figura 8A**).

Além de *IL4*, a expressão de *IL5* também foi avaliada, e foi observado que os pacientes de LCC<2a ($4,6 \times 10^6 \pm 3,3 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $3,1 \times 10^6$ cópias de RNA, n=11, $p<0,05$) apresentaram uma expressão mais elevada desta citocina quando comparado com os pacientes LCC>2a ($8,4 \times 10^6 \pm 10 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $1,0 \times 10^6$ cópias de RNA, n=9). Além disso, os indivíduos de CE ($6,4 \times 10^6 \pm 4,9 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $6,1 \times 10^6$ cópias de RNA, n=05) apresentaram uma expressão

elevada de *IL5* quando comparada com os LCC>2a ($5,7 \times 10^6 \pm 12 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $0,8 \times 10^6$ cópias de RNA, n=09, $p < 0,05$) e IS ($2,6 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $2,0 \times 10^6$ cópias de RNA, n=05, $p < 0,05$) (**Figura 8B**).

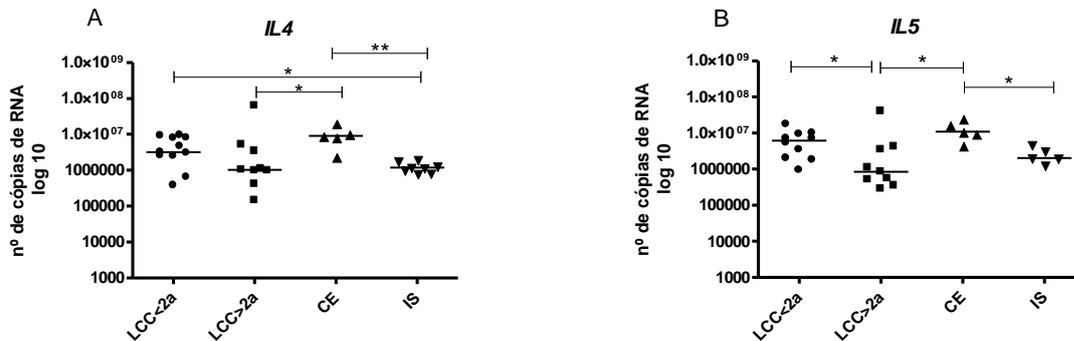


Figura 8: Expressão de *IL4* e *IL5* em células mononucleares de pacientes de leishmaniose. Foram estudados pacientes de leishmaniose cutânea curada há menos de dois anos (LCC<2a), leishmaniose cutânea cura há mais de dois anos (LCC>2a), cura espontânea (CE) e indivíduos saudáveis (IS). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram ativadas *in vitro* por antígenos de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb). O RNA foi extraído, e os transcritos específicos foram quantificados por PCR em tempo real. **A:** Número de cópias de RNAm de *IL4* em amostras de células de pacientes LCC<2a (n=11), LCC>2a (n=09), CE (n=05) e IS (n=08). **B:** Número de cópias de RNAm de *IL5* em amostras de células de pacientes LCC<2a (n=08), LCC>2a (n=07), CE (n=04) e IS (n=07). Cada ponto representa um indivíduo. Medianas são representadas por linhas horizontais. N: número; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Valor do p obtido pelo teste t não-paramétrico de Mann-Whitney.

3.4.3 Expressão gênica da citocina *IL10* e do fator transcricional *FOXP3* e em células estimuladas com antígeno de *L. braziliensis*.

Sabendo que Foxp3 é uma molécula associada à célula T reguladora e que a indução de um mecanismo regulador é essencial para a manutenção de um bom prognóstico da doença, foi avaliada a indução da expressão de *FOXP3* em CMSP frente aos antígenos de *L. braziliensis*. Os resultados demonstram que os CE ($10,6 \times 10^6 \pm 6,1 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $13,3 \times 10^6$ cópias de RNA, n=05) exibiram maior expressão desta molécula quando comparado com o grupo LCC<2a ($1,5 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $1,4 \times 10^6$ cópias de RNA, n=11, $p < 0,05$), LCC>2a ($9,2 \times 10^6 \pm 20,2 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana= $1,5 \times 10^6$ cópias de RNA, n=07, $p < 0,05$) e IS

($2,2 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana = $1,9 \times 10^6$ cópias de RNA, $n=07$, $p<0,01$) (**Figura 9A**).

A citocina IL-10 foi descrita na leishmaniose como uma das citocinas que pode tanto favorecer a replicação do parasito (Padigel et al 2003, Belkaid et al 2001), como limitar a magnitude da resposta imune efetora, função que concede a elas o papel de citocinas imunoreguladoras (Castellano et al 2009).

Ao analisamos as células estimuladas com Ag-Lb nos diferentes grupos, foi observado que o grupo de CE ($15,8 \times 10^6 \pm 12,2 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana = $12,9 \times 10^6$ cópias de RNA, $n=05$) apresentou maior expressão de *IL10* quando comparado com o grupo LCC<2a ($5,9 \times 10^6 \pm 11 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana = $1,9 \times 10^6$ cópias de RNA, $n=10$, $p<0,05$). Além disso, o grupo dos LCC<2a ($8,1 \times 10^6 \pm 6,1 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana = $7,5 \times 10^6$ cópias de RNA, $n=11$) obteve maior expressão desta molécula quando comparado aos IS ($2,9 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$ cópias de RNA, mediana = $2,6 \times 10^6$ cópias de RNA, $n=08$, $p<0,05$) (**Figura 9B**).

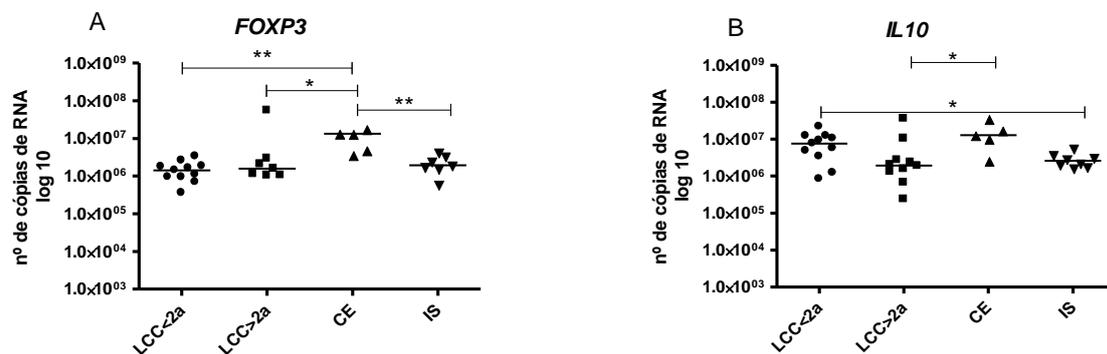


Figura 9: Expressão do fator transcricional *FOXP3* e da *IL10* em células mononucleares de pacientes de leishmaniose. Foram estudados pacientes de leishmaniose cutânea curada há menos de dois anos (LCC<2a), leishmaniose cutânea cura há mais de dois anos (LCC>2a), cura espontânea (CE) e indivíduos saudáveis (IS). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram ativadas *in vitro* por antígenos de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb). O RNA foi extraído, e os transcritos específicos foram quantificados por PCR em tempo real. **A:** Número de cópias de RNAm de *FOXP3* em amostras de células de pacientes LCC<2a ($n=11$), LCC>2a ($n=07$), CE ($n=05$) e IS ($n=07$). **B:** Número de cópias de RNAm de *IL10* em amostras de células de pacientes LCC<2a ($n=10$), LCC>2a ($n=09$), CE ($n=05$) e IS ($n=08$). Cada ponto representa um indivíduo. Medianas são representadas por linhas horizontais. N: número; * $p<0,05$, ** $p<0,01$. Valor do p obtido pelo teste t não-paramétrico de Mann-Whitney.

3.4.4 A razão entre a expressão de *IFNG* e *IL10* e entre *TBET* e *GATA3* em células estimuladas com antígenos de *Leishmania braziliensis*

Além da expressão gênica de *IFNG* e *IL10* separadamente, foi avaliada também a razão entre essas citocinas, considerando que o balanço entre elas seja importante fator para a manutenção de uma resposta protetora na LTA (Gomes-Silva et al 2007). A razão média entre essas citocinas foi comparada entre os diferentes grupos, e os resultados demonstraram que esta era similar para LCC<2a ($1,1 \pm 1,0$, mediana= 1,0 n=10), LCC>2a ($2,6 \pm 3,8$, mediana= 1,5, n=09), CE ($1,3 \pm 0,5$, mediana= 1,2, n=05) e IS ($1,2 \pm 0,3$, mediana= 1,2, n=06) (**Figura 10A**).

Em adição, foi estudada também a razão entre *TBET* e *GATA3*, visto que Chakir e colaboradores (2003) acreditam que esta razão possa ser considerada um marcador do perfil Th1/Th2. O presente estudo demonstrou que o grupo LCC<2a ($3,9 \pm 6,7$, mediana= 1,0, n=07) apresentou uma razão mais elevada quando comparado com o LCC>2a ($1,2 \pm 1,4$, mediana= 0,5, n=07, $p < 0,05$), CE ($0,1 \pm 0,1$, mediana= 0,1, n=04, $p < 0,05$) e IS ($0,1 \pm 0,06$, mediana= 0,18, n=04, $p < 0,05$). O grupo LCC>2a obteve ainda maior expressão do que os CE ($p < 0,05$) e os IS ($p < 0,05$) (**Figura 10B**).

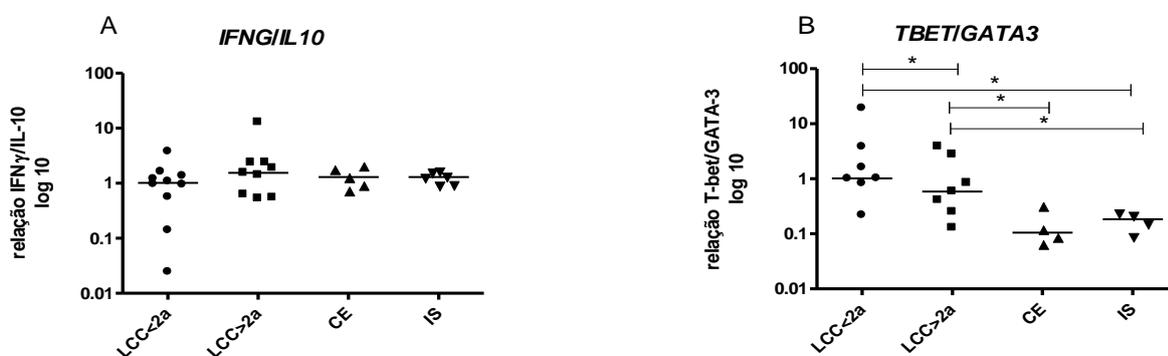


Figura 10: Expressão da razão *IFNG/IL10* e *TBET/GATA3* em células mononucleares de pacientes de leishmaniose. Foram estudados pacientes de leishmaniose cutânea curada há menos de dois anos (LCC<2a), leishmaniose cutânea cura há mais de dois anos (LCC>2a), cura espontânea (CE) e indivíduos saudáveis (IS). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram ativadas *in vitro* por antígenos de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb). O RNA foi extraído, e os transcritos específicos foram quantificados por PCR em tempo real. **A:** Número de cópias de RNAm de *IFNG/IL10* em amostras de células de pacientes LCC<2a (n=10), LCC>2a (n=09), CE (n=05) e IS (n=06). **B:** Número de cópias de RNAm da razão *TBET/GATA3* em amostras de células de pacientes LCC<2a (n=07), LCC>2a (n=07), CE (n=04) e IS (n=04). Cada ponto representa um indivíduo. Medianas são representadas por linhas horizontais. N: número; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Valor do p obtido pelo teste t não-paramétrico de Mann-Whitney.

3.4.5 Expressão gênica das citocinas *IFNG*, *IL10*, *IL12A*, *IL18*, *IL4*, *IL5*, e dos fatores transcricionais *TBET*, *GATA3* e *FOXP3* em células sem estímulo e estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis*.

Após a avaliação da expressão gênica de fatores transcricionais e citocinas em células mononucleares estimuladas com antígeno de *Leishmania*, foram investigados se a expressão dessas moléculas é específica ao estímulo antigênico. Para isso, CMSP de pacientes curados após o tratamento e de indivíduos que evoluíram para cura espontânea foram colocadas em cultura na ausência ou na presença do antígeno de *Leishmania braziliensis*.

Os resultados demonstraram que de maneira geral há um aumento não significativo na expressão da maioria dos genes avaliados quando comparamos as células sem estímulo (BG) com aquelas que foram estimuladas com Ag-Lb. Este padrão pôde ser observado tanto nos pacientes curados (LCC) como nos indivíduos que evoluíram para a cura espontânea (CE) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Quantificação do RNA de citocinas e fatores transcricionais em células não-estimuladas e estimuladas com antígenos de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb) nos pacientes curados clinicamente de leishmaniose cutânea.

Número de cópias de RNA em células mononucleares cultivadas in vitro (x10 ⁶)						
Genes	Curados de leishmaniose cutânea (LCC)			Cura espontânea (CE)		
	Sem estímulo (BG)	Ag-Lb	<i>p</i>	Sem estímulo (BG)	Ag-Lb	<i>p</i>
IFNG	2,9±3,0	6,4±6,1	0.4	11±7,5	15±7,3	0,2
IL10	2,8±1,7	5,7±11	0.5	8,5±5,3	15±12	0,4
IL12A	1,7±1,2	2,8±3,4	0.8	4,2±2,0	9,7±7,2	<0,05
IL18	0,1±0,2	0,5±0,8	0.4	0,1±0,02	8,1±12	0,1
IL4	1,7±1,1	9,1±2,1	0.5	5,1±2,6	10±6,5	0,09
IL5	2,5±1,3	1,7±1,5	0.5	8,5±5,0	13±7,9	0,3
TBET	0,9±0,5	12,6±10	0.9	1,4±0,6	2,4±1,1	0,3
GATA3	4,5±2,3	12±10	0.1	10±7,1	19±10	0,2
FOXP3	2,3±0,8	10±11	0.9	9,1±7,9	10±6,1	0,7

Os resultados foram demonstrados por média ± desvio padrão do número de cópias de RNA. Ag-Lb: antígeno de *Leishmania braziliensis*. BG: cultura sem estímulo. LCC: leishmaniose cutânea curada. CE: cura espontânea. Valor do *p* obtido pelo teste *t* não-paramétrico de Mann-Whitney.

No entanto, ao comparar a média do BG dos pacientes LCC com a média do BG dos CE, foi observado que o BG dos CE apresentou uma diferença significativa na expressão de *IFNG*, *IL10* e *IL4* (*p*<0,05 respectivamente) quando comparado com o BG dos LCC, indicando que estes pacientes apresentam naturalmente um potencial

intrínseco de expressar certas moléculas, mesmo sem a intervenção do antígeno (**Tabela 3**).

Tabela 3: Quantificação de RNA de citocinas e fatores transcricionais em células não-estimuladas pelos antígenos de *Leishmania braziliensis* nos pacientes curados clinicamente de leishmaniose cutânea.

Número de cópias de RNA em células mononucleares cultivadas in vitro (x10⁶)			
Genes	Sem estímulo		p
	Curados de leishmaniose cutânea (LCC)	Cura espontânea (CE)	
IFNG	2,9±3,0	11±7,5	0,01*
IL10	2,8±1,7	8,5±5,3	0,02*
IL12A	1,7±1,2	4,2±2,0	0,08
IL18	0,1±0,2	0,1±0,02	1,00
IL4	1,7±1,1	5,1±2,6	0,04*
IL5	2,5±1,3	8,5±5,0	0,09
TBET	0,9±0,5	1,4±0,6	0,4
GATA3	4,5±2,3	10±7,1	0,06
FOXP3	2,3±0,8	9,1±7,9	0,08

Os resultados foram demonstrados por média ± desvio padrão do número de cópias de RNA. Ag-Lb: antígeno de *Leishmania braziliensis*. BG: cultura sem estímulo. LCC: leishmaniose cutânea curada. CE: cura espontânea. Valor do p obtido pelo teste t não-paramétrico de Mann-Whitney. * Valores de p<0,05.

3.4.6 Correlações entre e a expressão de genes associados aos perfis tipo 1, tipo 2 ou regulatório em células estimuladas com antígenos de *Leishmania braziliensis* nos pacientes curados de leishmaniose cutânea e nos indivíduos sadios.

Após observado o panorama individual de expressão gênica de alguns dos componentes da resposta imunológica, foram realizadas matrizes de correlações entre esses componentes para cada um dos grupo de pacientes curados e dos indivíduos sadios (IS, LCC<2a, LCC>2a e CE). As correlações encontradas nos indivíduos sadios (IS) foram demonstradas pela Figura 11, e àquelas que apresentaram significância foram destacadas na Tabela 4.

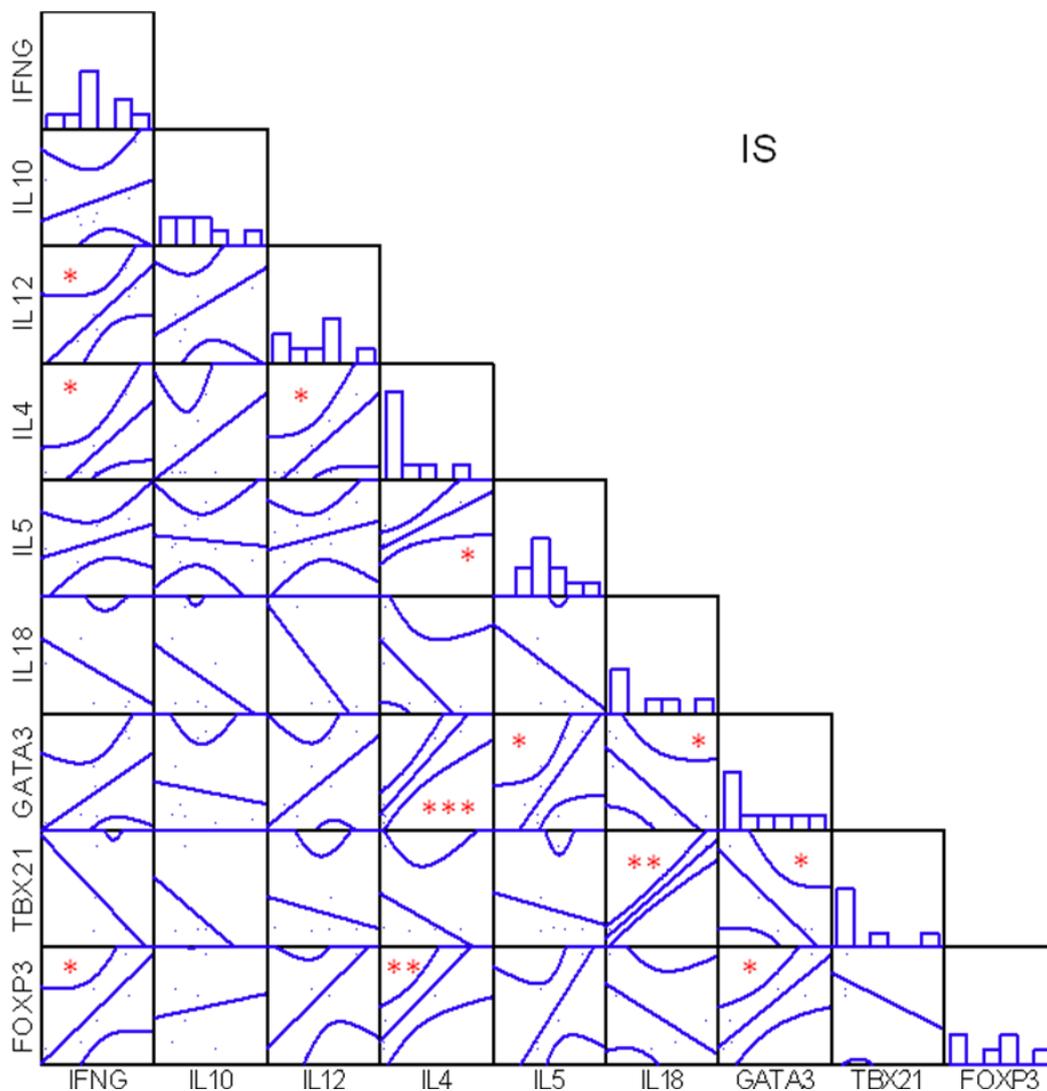


Figura 11: Correlação entre os níveis de expressão gênica em amostras de indivíduos sadios (IS). Correlações entre citocinas e fatores transcripcionais associado ao perfil tipo 1, tipo 2 ou regulatório considerando as células estimuladas com Ag-Lb de pacientes IS. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 4: Correlação entre a expressão de pares de genes de citocinas e fatores transcricionais obtidos de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis* de amostras de indivíduos saudáveis.

Genes correlacionados	Valor de p	Coefficiente de correlação (r)	Número de amostras analisadas (n)
<i>IL-12A vs IFNG</i>	0,02	0,80	07
<i>IL4 vs IFNG</i>	0,02	0,78	08
<i>IL4 vs IL12A</i>	0,03	0,79	07
<i>IL5 vs IL4</i>	0,01	0,79	09
<i>GATA3 vs IL4</i>	0,007	0,93	08
<i>GATA3 vs IL5</i>	0,01	0,75	09
<i>GATA3 vs IL18</i>	0,03	-0,83	06
<i>IL18 vs TBET</i>	0,001	0,99	04
<i>TBET vs GATA3</i>	0,03	-0,90	05
<i>FOXP3 vs IFNG</i>	0,04	0,82	06
<i>FOXP3 vs IL4</i>	0,009	0,91	06
<i>FOXP3 vs GATA3</i>	0,01	0,91	06

Valores do p obtidos pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman.

Considerando as amostras dos pacientes LCC<2a foram feito correlações entre os genes de interesse, e estas foram demonstradas pela Figura 12 e na Tabela 5.

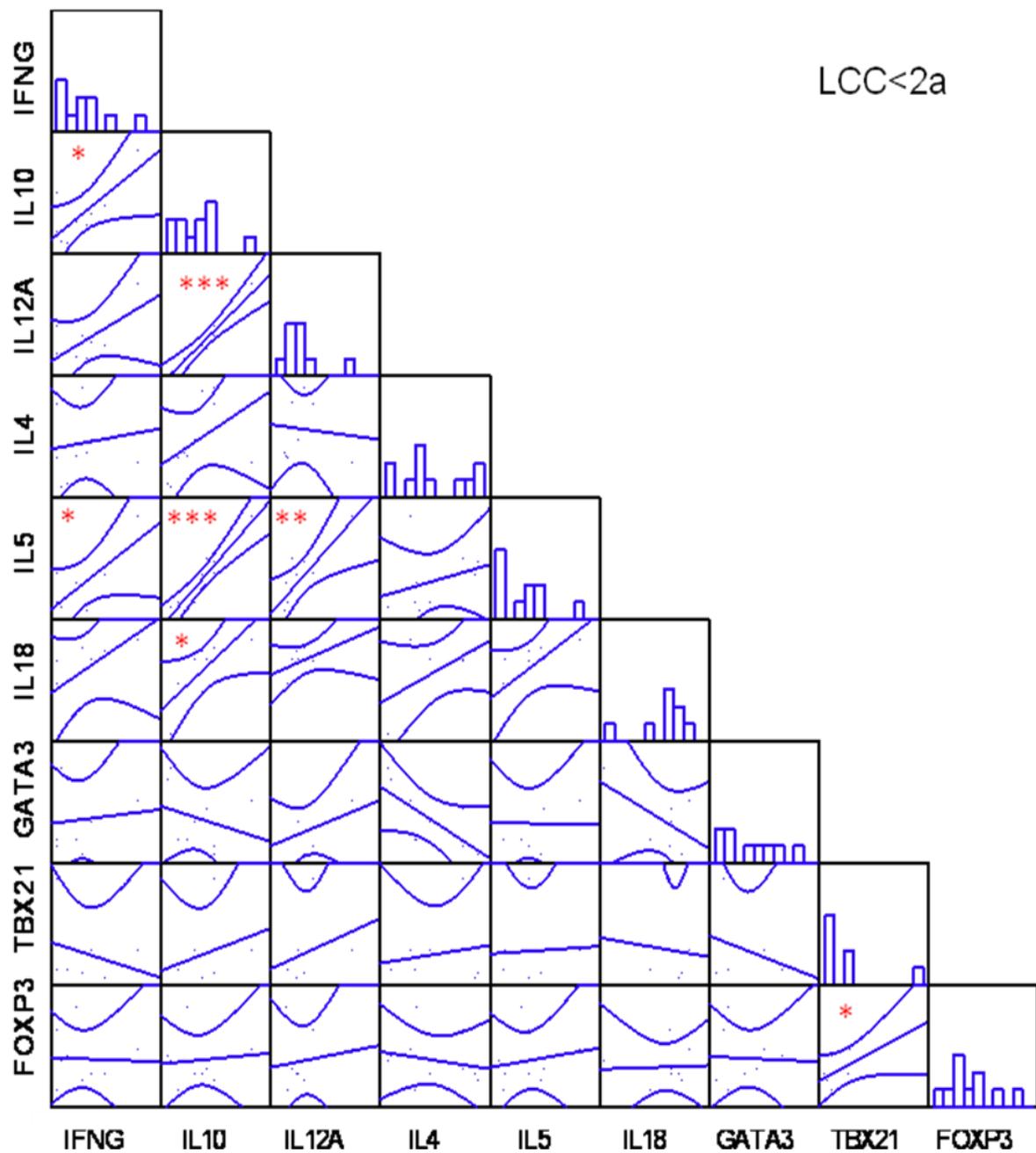


Figura 12: Correlação entre os níveis de expressão gênica em amostras de pacientes curados há menos de dois anos. Correlações entre citocinas e fatores transcripcionais associado ao perfil Th1, Th2 ou regulatório considerando as células estimuladas com Ag-Lb de pacientes LCC<2a. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 5: Correlação entre a expressão de pares de genes de citocinas e fatores transcricionais obtidos de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis* de amostras de pacientes curados há menos de dois anos.

Genes correlacionados	Valor de p	Coefficiente de correlação (r)	Número de amostras analisadas (n)
<i>IFNG vs IL10</i>	0,01	0,73	10
<i>IFNG vs IL5</i>	0,03	0,69	09
<i>IL12A vs IL10</i>	0,00008	0,95	09
<i>IL5 vs IL10</i>	0,00006	0,93	10
<i>IL5 vs IL12A</i>	0,005	0,83	09
<i>IL18 vs IL12A</i>	0,01	0,79	08
<i>TBET vs IL18</i>	0,03	0,79	07

Valores do p obtidos pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman.

Observamos também os genes que se correlacionavam nos pacientes LCC>2a. As correlações encontradas nestes indivíduos foram demonstradas pela Figura 13, e àquelas que apresentaram significância foram destacadas na Tabela 6.

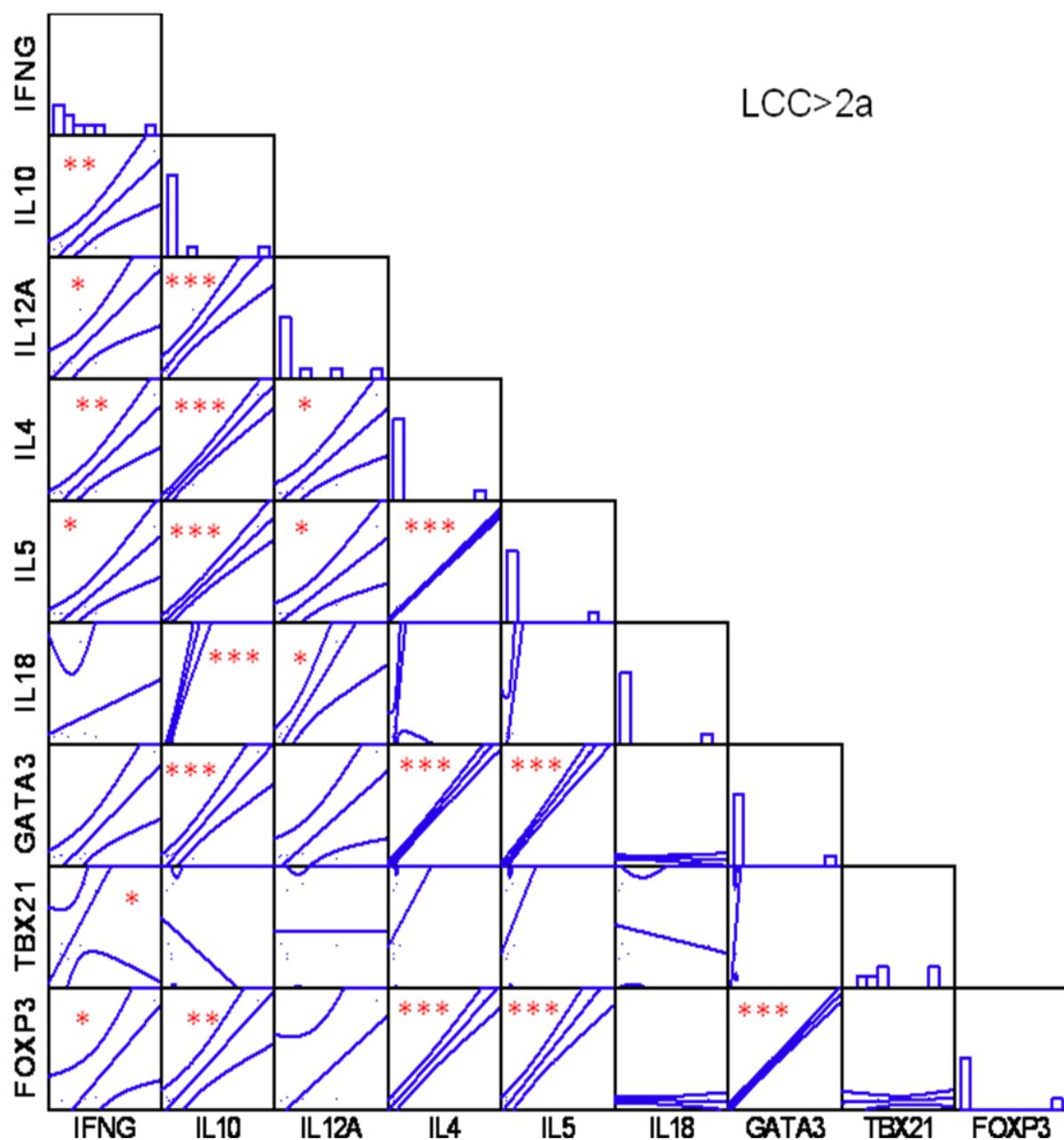


Figura 13: Correlação entre os níveis de expressão gênica em amostras de pacientes curados há mais de dois anos. Correlações entre citocinas e fatores transcripcionais associado ao perfil Th1, Th2 ou regulatório considerando as células estimuladas com Ag-Lb de pacientes LCC > 2 a. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 6: Correlação entre a expressão de pares de genes de citocinas e fatores transcricionais obtidos

Genes correlacionados	Valor de p	Coefficiente de correlação (r)	Número de amostras analisadas (n)
<i>IFNG vs IL10</i>	0,0001	0,89	09
<i>IFNG vs IL12A</i>	0,002	0,86	09
<i>IL12A vs IL10</i>	0,00007	0,95	09
<i>IL4 vs IFNG</i>	0,0005	0,91	09
<i>IL4 vs IL10</i>	0,0000003	0,98	09
<i>IL4 vs IL12A</i>	0,001	0,88	09
<i>IL5 vs IFNG</i>	0,001	0,91	08
<i>IL5 vs IL10</i>	0,00001	0,98	08
<i>IL5 vs IL12A</i>	0,002	0,89	08
<i>IL5 vs IL4</i>	1,08E-09	0,99	08
<i>IL18 vs IL10</i>	0,00003	0,97	08
<i>IL18 vs IL12A</i>	0,02	0,92	07
<i>GATA3 vs IL10</i>	0,0001	0,96	08
<i>GATA3 vs IL4</i>	0,0000001	0,99	08
<i>GATA3 vs IL5</i>	0,0000007	0,99	08
<i>TBET vs IFNG</i>	0,04	0,81	06
<i>FOXP3 vs IFNG</i>	0,01	0,94	05
<i>FOXP3 vs IL10</i>	0,002	0,96	06
<i>FOXP3 vs IL4</i>	0,0002	0,99	05
<i>FOXP3 vs IL5</i>	0,0006	0,99	05
<i>FOXP3 vs GATA3</i>	0,00001	0,99	05

de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis* de amostras de pacientes curados há mais de dois anos

Valores do p obtidos pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman.

Adicionalmente, observamos correlações entre os genes de pacientes que evoluíram para a cura espontânea (CE). As correlações encontradas foram demonstradas pela Figura 14, e àquelas que apresentaram significância foram destacadas na Tabela 7.

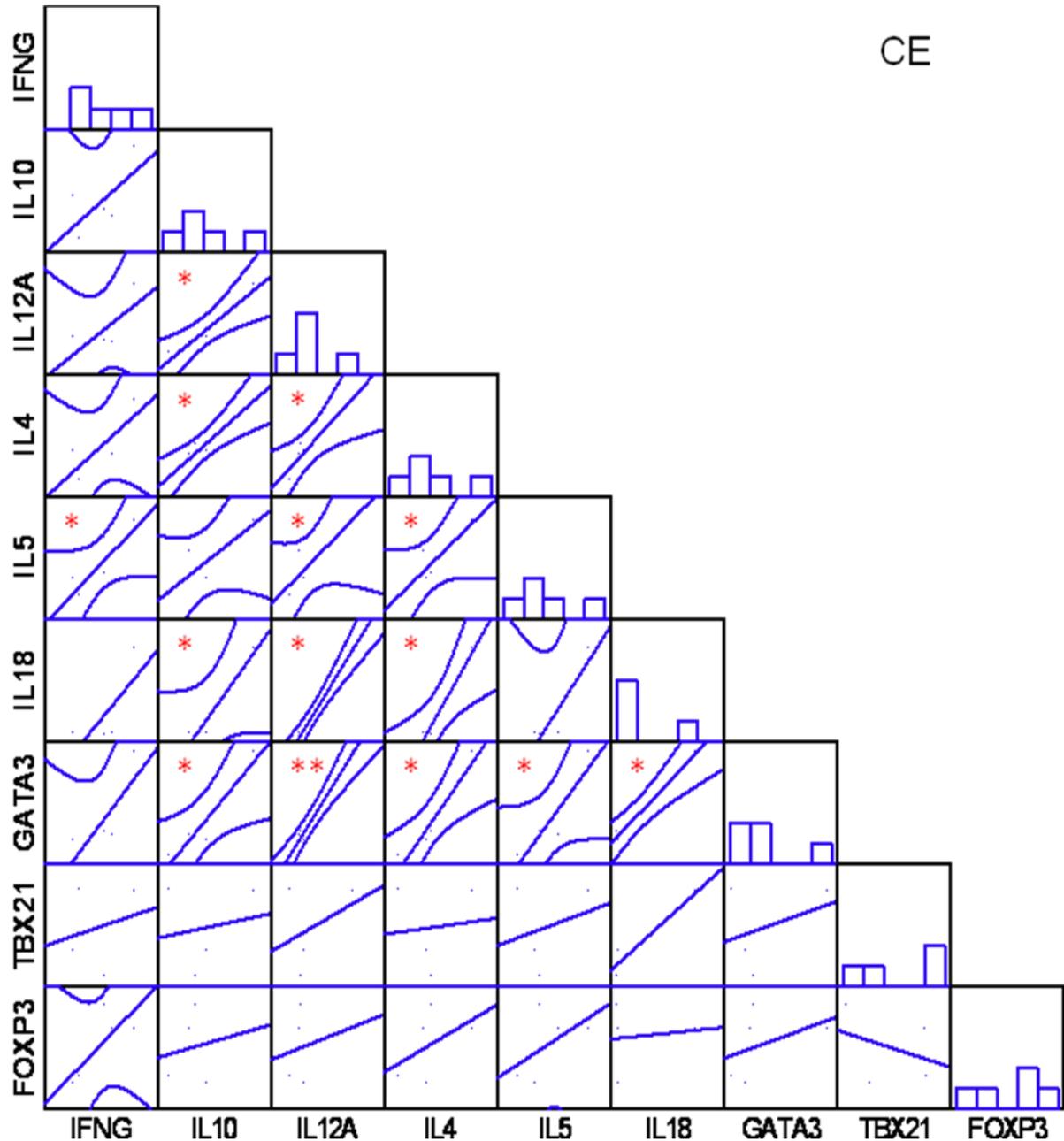


Figura 14: Correlação entre os níveis de expressão gênica em amostras de pacientes que evoluíram para a cura espontânea (CE). Correlações entre citocinas e fatores transcripcionais associado ao perfil Th1, Th2 ou regulatório considerando as células estimuladas com Ag-Lb de pacientes CE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 7: Correlação entre a expressão de pares de genes de citocinas e fatores transcricionais obtidos de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis* de amostras de pacientes que evoluíram para cura espontânea.

Genes correlacionados	Valor de p	Coefficiente de correlação (r)	Número de amostras analisadas (n)
<i>IL12A vs IL10</i>	0,006	0,96	05
<i>IL4 vs IL10</i>	0,004	0,97	05
<i>IL4 vs IL12A</i>	0,01	0,95	05
<i>IL5 vs IFNG</i>	0,03	0,91	05
<i>IL5 vs IL12A</i>	0,04	0,88	05
<i>IL5 vs IL4</i>	0,03	0,90	05
<i>IL18 vs IL10</i>	0,03	0,96	04
<i>IL18 vs IL12A</i>	0,02	0,99	04
<i>IL18 vs IL4</i>	0,01	0,98	04
<i>GATA3 vs IL10</i>	0,01	0,94	05
<i>GATA3 vs IL12A</i>	0,0009	0,99	05
<i>GATA3 vs IL4</i>	0,008	0,96	05
<i>GATA3 vs IL5</i>	0,02	0,91	05
<i>GATA3 vs IL18</i>	0,005	0,99	05

Valores do p obtidos pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman.

4. Discussão

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um grave problema de saúde pública. As perspectivas de controle são ainda dependentes de um progresso na obtenção de melhores ferramentas que possam ser eficazes no controle do número de casos da doença. A estratégia profilática mais expressiva seria o desenvolvimento de uma vacina, capaz de proteger os indivíduos que vivem em áreas endêmicas, sob o risco de adquirir a infecção. No entanto, pouco se sabe sobre a resposta imune duradoura responsável pelo controle da infecção em indivíduos curados. Uma hipótese é que esta deva apresentar um equilíbrio entre mecanismos inflamatórios e reguladores, bem como favorecer a diferenciação de linfócitos T específicos a *Leishmania* em células efetoras e em células de memória.

As citocinas são consideradas mediadores principais responsáveis pela polarização do perfil de resposta imune de células T ativadas, capazes de se ligar aos seus respectivos receptores presentes na superfície da célula, e desencadear sinalizações intracelulares, que irão culminar na ativação ou supressão de genes responsáveis pela determinação de uma resposta imune favorável ou não ao controle da leishmaniose.

Baseado nisso, nosso objetivo foi avaliar o perfil de expressão gênica de moléculas envolvidas na resposta imune de indivíduos capazes de controlar o parasito e evoluir para cura clínica. Para isso, foram realizadas análises quantitativas de genes que codificam para citocinas e fatores transcricionais associados às respostas efetoras do tipo 1 (*IFNG*, *IL12A*, *IL18*, *TBET*), tipo 2 (*IL4*, *IL5*, *GATA3*) e reguladora (*IL10*, *FOXP3*). Essa avaliação também foi associada com o tempo de cura dos indivíduos estudados, na tentativa de estabelecer correlações que possam auxiliar na compreensão da resposta imune associada ao bom prognóstico, ou seja, desenvolvimento e manutenção da cura na leishmaniose cutânea. Além disso, é possível que este perfil de resposta imune apresentado pelos indivíduos curados há longo tempo, seja o padrão de interesse que deva ser desenvolvido em um indivíduo vacinado, conferindo imunidade protetora na LTA.

De fato, deveríamos ter acompanhado os pacientes desde a fase ativa, até após a cura clínica, a fim de que o padrão de expressão gênica relacionado com o estabelecimento e manutenção da cura clínica fossem melhor descrito. No entanto, devido às dificuldades de se conseguir pacientes ativos, não foi possível realizar esta avaliação. Uma das formas de avaliar como o sistema imune de um indivíduo curado de

leishmaniose responde frente a uma possível reativação ou reinfecção da *Leishmania* é através de ensaios *in vitro* onde as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) são colocadas frente aos antígenos de *Leishmania*. Após o reconhecimento antigênico através do complexo peptídeo-MHC apresentado pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), linfócitos T virgens recebem sinais através do receptor de antígeno e de moléculas co-estimulatórias. Esse conjunto de sinais, juntamente com um ambiente apropriado rico em mediadores solúveis como citocinas e quimiocinas, permitem a ativação dessas células e uma conseqüente expansão clonal. Essa capacidade dos clones de células específicas serem ativadas pode ser mensurada pela resposta proliferativa de linfócitos (RPL). Além disso, os clones específicos circulantes que já reconheceram previamente os antígenos e que estão em um estado de repouso (células de memória), podem também retornar a sua atividade proliferativa após um novo contato com uma célula apresentadora de antígeno (APC).

Na leishmaniose, diversos trabalhos têm ressaltado a capacidade dos linfócitos de responderem a antígenos de *Leishmania* através de ensaios de RPL, utilizando como parâmetros a contagem por minuto (cpm) e o índice de estimulação (IE). Cástes e colaboradores (1983) encontraram uma RPL maior nos pacientes com LM durante a fase ativa quando comparado com os pacientes de LC. Contudo, Conceição-Silva e colaboradores (1990) não observaram uma correlação entre o IE da RPL e as formas clínicas avaliadas (LC e LM). Mendonça e colaboradores (1986) encontram IEs similares nos pacientes de leishmaniose cutânea antes e após o tratamento. Por outro lado, Toledo e colaboradores (2001) demonstram ocorrer uma diminuição da resposta proliferativa de linfócitos após o término do tratamento, quando comparado com a fase ativa da doença. Da mesma maneira, Da-Cruz e colaboradores (1994) indicaram uma tendência de declínio dos IEs quando comparados pacientes antes e após o tratamento, porém sem diferença significativa. Em conjunto, esses trabalhos demonstram a grande dificuldade de associar resultados referentes à RPL com o perfil clínicos dos pacientes.

No presente estudo foi observada uma RPL positiva ($IE > 2,5$) para todos os indivíduos curados de leishmaniose cutânea; sugerindo que independente do tempo de cura e do tipo de evolução clínica para a cura, todos eles apresentavam linfócitos de memória específicos aos antígenos de *Leishmania*. Como esperado os indivíduos saudáveis, não moradores de áreas endêmicas, não apresentaram reatividade aos antígenos de *Leishmania*. Porém, foi encontrada grande variação nos IEs tanto dos

pacientes curados há menos de dois anos, quanto dos pacientes curados há mais de dois anos.

Como a RPL não foi capaz de discriminar pacientes de leishmaniose com cura recente ou tardia, passou-se a avaliar se o tempo de cura levaria a alterações no perfil de expressão gênica relacionado a um perfil tipo 1, tipo 2 e regulador.

A molécula IFN- γ é considerada uma das principais citocinas representativas do perfil tipo 1, que apresenta um papel importante no controle da infecção por *Leishmania* por mediar a ativação de macrófagos e a destruição de parasitos intracelulares (de Souza-Neto et al 2004).

Estudos realizados têm demonstrado uma elevada produção e expressão gênica de IFN- γ durante a fase ativa da leishmaniose cutânea (Pirmez et al 1993, Cáceres-Dittmar et al 1993, Amato et al 2003). Por outro lado, a evolução para a cura tem sido associada com a manutenção dos níveis de produção de IFN- γ encontrados durante a fase ativa da doença, tanto em pacientes com LC (Da-Cruz et al 2002, Castellano et al 2009), como em pacientes de LM (Da-Cruz et al 2002).

Nossos resultados demonstraram que os pacientes de CE apresentaram uma maior expressão de *IFNG* quando comparado com os pacientes curados de leishmaniose cutânea há mais de dois anos (LCC>2a) e com os indivíduos saudáveis (IS). Esses dados corroboram com os resultados apresentados por Carvalho e colaboradores (1995) que demonstraram que os pacientes que evoluem para a cura espontânea apresentam níveis de produção de IFN- γ elevados, similares até aos encontrados em pacientes de leishmaniose mucosa. Além disso, no presente estudo, o número de cópias de RNAm para *IFNG* em pacientes de CE, foi maior tanto em células estimuladas com antígenos de *Leishmania*, quanto na ausência do estímulo, sugerindo que esses indivíduos apresentam uma maior capacidade de expressão desta citocina. Variações genéticas numa dada população como os polimorfismos de base única (SNPs) podem ocorrer em genes para algumas citocinas incluindo o *IFNG* que irão determinar uma maior ou menor transcrição gênica de acordo com o genótipo apresentado pelo indivíduo. Experimentos avaliando o polimorfismo +874T/A que ocorrem no gene de *IFNG* em indivíduos portadores das formas mucosas e cutânea da LTA, demonstraram que dentre os indivíduos de LC, o grupo portador do genótipo TT apresentou a maior secreção dessa citocina (Matos et al 2007). Assim, é possível que os indivíduos de cura espontânea possam apresentar uma ou algumas associações de SNPs que os definem

como indivíduos que expressam altas quantidades de *IFNG*, o que contribui para a manutenção de um “status” de ativação de macrófagos compatível com o controle eficaz do parasito. Outra provável explicação para a elevada expressão desta molécula nesses indivíduos seria a presença de fatores epigenéticos. Ao contrário da informação genética, o contexto epigenético não é codificado por mudanças na seqüência do DNA, mas pelo diferencial na metilação do DNA e modificações na cromatina, que podem afetar os genes específicos expressos em uma determinada célula. Neste sentido, Agarwal e colaboradores (1998) demonstrou que a hipometilação e a hipersensitividade DNaseI no locus do gene do *IFNG* correlaciona-se com o aumento da expressão desta citocina em células do tipo 1 (Agarwal et al 1998, Avni et al 2000). Sendo assim, é possível que pacientes de cura espontânea apresentem modificações epigenéticas no gene de *IFNG*, que poderia colaborar para uma maior expressão desta molécula nesses indivíduos.

Baseado nisso, nossos dados podem sugerir que mesmo após a cura clínica, a alça que regula a expressão de *IFNG* continua sendo modulada positivamente nestes indivíduos de cura espontânea, provavelmente devido à circulação de células de memória do tipo 1 específicas a *Leishmania*, o que contribui para manutenção deste prognóstico favorável da doença. Sabendo que a cura na leishmaniose não é estéril, acredita-se que os pacientes de cura espontânea apresentam uma manutenção parasitária maior quando comparados com os indivíduos que curaram através de intervenção terapêutica, o que ressalta a necessidade de se manter elevada expressão do *IFNG*, visto que esta citocina tem papel fundamental no controle da infecção.

De maneira similar, o fator transcricional T-bet, apresentou maior expressão nos indivíduos que evoluíram para a cura espontânea quando comparado com os pacientes curados há mais de dois anos e indivíduos saudáveis. A expressão desse fator também pode ser um dos mecanismos de regulação da produção de IFN- γ , visto que T-bet está diretamente associado com o aumento da expressão desta citocina, se ligando na região promotora do gene e ativando a transcrição do RNA para mesma (Szabo et al 2000).

Além de T-bet, outras moléculas como IL-12 e IL-18 podem contribuir indiretamente na estabilidade da resposta imune do tipo 1. A citocina IL-12 tem funções pleiotrópicas que promovem a resposta imune celular através de diversos mecanismos. Além disso, ela pode induzir a expressão e produção de IFN- γ por células NK e células T, um efeito que pode ser sinergicamente acentuado através da citocina IL-18 (Yoshimoto et al 1998).

Na leishmaniose, estudos em modelo experimental têm demonstrado que a IL-12 é essencial na manutenção de um fenótipo Th1 durante a infecção por *L. major* (Sypek et al 1993, Sacks et al 2002). Entretanto, o papel da IL-18 na leishmaniose parece não ser tão definido como o da IL-12. Camundongos C57BL/6 resistentes a *Leishmania*, mas deficientes do gene da *IL18*, desenvolvem grandes lesões na fase inicial da infecção por *L. major*. No entanto, com a evolução da doença, estes camundongos são capazes de resolver estas lesões eficientemente assim como os camundongos selvagens (Monteforte et al 2000). Dados de nosso grupo mostraram que a IL-18 é produzida em células de pacientes de LM estimuladas com Ag-Lb, embora não tenham sido comparadas diferentes formas clínicas ou fases de doença (Nogueira et al. em redação). Conjuntamente, esses trabalhos indicam que apesar da IL-12 estar envolvida diretamente com a manutenção de uma resposta protetora contra o parasito, o papel da citocina IL-18 parece não estar ainda bem definido na leishmaniose.

No presente estudo foi avaliada a expressão da subunidade p35 da IL-12 (*IL-12A*) em amostras de células de pacientes curados e de indivíduos saudáveis, por acreditarmos que, apesar desta molécula ser compartilhada com outra citocina denominada IL-35, a sua expressão parece estar muito mais associada em linfócitos com do gene *IL12*. Além disso, foi avaliada a expressão de *IL18*, a fim de tentar compreender a alça que induz a expressão de *IFNG* e de *TBET* nestes pacientes.

Os resultados demonstraram que pacientes de cura espontânea (CE) apresentaram uma maior expressão de *IL12A* quando comparado aos pacientes curados há mais de dois anos (LCC>2a) e indivíduos saudáveis (IS). Da mesma forma, pacientes curados há menos de dois anos (LCC<2a) apresentaram maior expressão do gene da *IL12A* quando comparado com os pacientes LCC>2a e com os IS.

Assim como o encontrado para a expressão de *TBET* e *IFNG*, o gene da *IL12A* também foi regulado positivamente nos pacientes de cura espontânea. Além disso, o número de cópias de RNA para *IL12A* foi maior tanto em células estimuladas com antígenos de *Leishmania*, como em células não estimuladas, sugerindo que estes indivíduos naturalmente apresentam uma capacidade intrínseca de expressar esta molécula. Entretanto, apesar da IL-18 atuar conjuntamente com a IL-12 na indução do perfil tipo 1, não foi encontrado uma expressão elevada desta citocina nesses indivíduos, indicando que a IL-18 possa estar sendo regulada nestes pacientes, a fim de controlar o desenvolvimento de uma resposta do tipo 1 exacerbada, e evitar com que esses indivíduos evoluam para a forma mais grave da doença.

Após observar as variações na expressão gênica de mediadores que participam de um ambiente do tipo 1, decidiu-se avaliar também a expressão de fatores e citocinas relacionados ao perfil do tipo 2. Baseado nisso, foram avaliadas a expressão de *IL4* e de *IL5* e do fator transcricional *GATA3* em amostras de células de pacientes curados de leishmaniose cutânea e de indivíduos saudáveis.

A *IL-4* e *IL-5* são citocinas que apresentam um importante papel na polarização das células T $CD4^+$, induzindo o fenótipo do tipo 2, tanto *in vitro* como *in vivo*. Além disso, estas moléculas são capazes de inibir a proliferação de células do tipo 1 e conseqüentemente diminuir a produção de $IFN-\gamma$, promovendo a proliferação do parasito e a disseminação da doença (Lehn et al 1989, Nelms et al 1998).

Estudos prévios têm associado à citocina *IL-4* com a patogênese da leishmaniose, visto que esta molécula foi detectada durante a doença ativa, mas não foi observada ou esteve reduzida após a terapia (Coutinho SG et al 1996, Da-Cruz et al 2002, Salhi et al 2008, Castellano et al 2009). Neste sentido, Kumar e colaboradores (2009) demonstraram que quanto maior a carga parasitária, maior a expressão de *IL4* nas lesões causadas por infecção por *L. tropica*, confirmando a possível relação desta citocina com a patogênese da doença. Sendo assim, a diminuição ou a ausência da produção de *IL-4* após o tratamento, pode constituir um importante passo para o estabelecimento da cura e para evitar a reativação da doença.

Quando a produção de *IL-5* foi investigada em pacientes de leishmaniose tegumentar, foi observado que durante a fase ativa, os níveis de *IL-5* foram maiores nos pacientes com LM do que nos pacientes com LC. Contudo, após a cura clínica foi observado uma diminuição dos níveis desta citocina nos pacientes com LM, mas não nos pacientes de LC, sugerindo que nestes pacientes, esta molécula não foi capaz de distinguir a resposta de células T durante a fase ativa e após a cura (Da-Cruz et al 2002, Bacellar et al 2002).

O atual estudo demonstrou que os pacientes de cura espontânea apresentaram uma maior expressão de *IL4*, quando comparado com os pacientes curados há mais de dois anos e com os indivíduos saudáveis. Resultados semelhantes foram encontrados também para a expressão de *IL5*. Além disso, pacientes LCC<2a apresentaram uma tendência em expressar níveis mais elevados de *IL4* e *IL5* quando comparado com os pacientes LCC>2a.

De maneira similar, foi observada uma maior expressão do fator transcricional *GATA3* nos pacientes de cura espontânea quando comparado aos demais indivíduos. A

expressão desta molécula está diretamente associada com a regulação de *IL4* e *IL5*, visto que *GATA3* é capaz de transativar a região promotora do gene da *IL5*, além de acentuar a expressão gênica de *IL4* e *IL13* (Skapenko et al 2004).

Assim como nos genes que contribuem para a produção de citocinas do tipo 1, o número de cópias de RNA para *IL4*, *IL5* e *GATA3* foi maior tanto em células estimuladas com antígenos de *Leishmania*, quanto na ausência do estímulo, sugerindo que também para citocinas do tipo 2 existe uma capacidade própria dos pacientes de cura espontânea expressarem naturalmente estas moléculas. A alça que favorece a expressão de citocinas do tipo 2 também parece ser regulada positivamente nestes pacientes, provavelmente contribuindo muito mais para o balanceamento da resposta imune do tipo 1 do que para a replicação do parasito.

Na tentativa de tentar compreender o processo de regulação que ocorre nestes pacientes curados de leishmaniose cutânea, foram estudados a expressão do gene da *IL10* e do fator transcricional *FOXP3*.

A IL-10 é a principal citocina moduladora da resposta imune na leishmaniose (Bacellar et al 2002, Faria et al 2005). Estudos em modelo experimental mostraram que a IL-10 pode favorecer o desenvolvimento de um mecanismo homeostático, capaz de evitar os efeitos deletérios da resposta imune. Além disso, esta citocina parece estar envolvida com a persistência parasitária após a cura clínica, processo importante para a manutenção da imunidade no hospedeiro (Belkaid et al 2001).

No modelo humano, estudos têm demonstrado que durante a fase ativa, pacientes com LM apresentam baixa produção desta citocina quando comparado com os pacientes LC (Bacellar et al 2002), provavelmente devido à capacidade do IFN- γ de regular a expressão do IL-10R em linfócitos (Faria et al 2005). Esses achados podem representar o principal mecanismo de desregulação da resposta imune nos LM, contribuindo para a exacerbação e severidade da doença.

Foi demonstrado que indivíduos curados, com um bom prognóstico da doença (assintomáticos, cura espontânea e pacientes curados de LC), apresentam uma maior capacidade de produzir IL-10 do que os pacientes curados de LM (Gomes-Silva et al 2007). Além disso, a ausência de doença nos indivíduos assintomáticos parece estar relacionada com a habilidade intrínseca de produzir altos níveis de IL-10, sendo maiores até do que os encontrados nos pacientes curados de LC (Bittar et al 2007).

A resposta imune pode ser ainda regulada pela presença de células T reguladoras (Treg) no ambiente. Elas são caracterizadas por apresentarem diversas moléculas na sua

superfície, sendo que o principal marcador específico desta linhagem é o fator transcricional Foxp3 (Belkaid et al 2003, Hori et al 2003, Sacks et al 2006, Damoiseaux et al 2006).

Alguns trabalhos destacam que em lesões causadas por *L. major*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* ocorrem um acúmulo de células Foxp3+ e uma supressão da proliferação e da produção de citocinas de células T efectoras (Campanelli et al 2006, Peters et al 2006, Salhi et al 2008). A hipótese que vem sendo estruturada é que a presença de células Treg nos sítios da infecção promove ainda a persistência parasitária e uma potencial transmissão do parasito para outros hospedeiros. Entretanto, a remoção das células Treg poderia levar à cura estéril, um estado que pode não ser compatível com a preservação da imunidade duradoura (Belkaid et al 2002, Belkaid et al 2005).

No presente estudo foi mostrada uma expressão elevada de *FOXP3* nos pacientes de cura espontânea quando comparado com os pacientes curados clinicamente há menos de dois anos, curados clinicamente há mais de dois anos e nos indivíduos saudáveis. Da mesma forma, casos de cura espontânea apresentaram uma maior expressão da *IL10* quando comparados com os pacientes curados há mais de dois anos, sugerindo que embora seja observado nos indivíduos de cura espontânea uma maior expressão de citocinas e fatores transcricionais associados ao perfil tipo 1 e tipo 2, fatores imunológicos relacionados com a regulação e a homeostasia da resposta imune também parecem estar expressos em maiores quantidades nesses indivíduos, contribuindo para o estabelecimento e a manutenção de um bom prognóstico da doença.

Adicionalmente, foi observada também a razão entre *IFNG* e *IL10*, e entre *TBET* e *GATA3*, sabendo que essas razões podem representar o perfil Th1/Th2 e podem prever a evolução clínica dos pacientes investigados (Chakir et al 2003). Os resultados demonstraram que todos os pacientes obtiveram uma razão semelhante entre *IFNG* e *IL10*, sendo esta próxima de um. Em relação à razão entre *TBET* e *GATA3* foi observado que os pacientes curados há menos de dois anos apresentaram uma razão mais elevada quando comparado com os demais casos. Além disso, os pacientes curados há mais de dois anos, obtiveram maior expressão desta razão do que os CE e IS.

Em conjunto, esses dados indicam que pacientes de CE apresentam um perfil misto de citocinas e fatores transcricionais do tipo 1 e do tipo 2 após a evolução para a cura. Este mesmo padrão também é encontrado nos pacientes de LM durante a fase ativa (Bacellar et al 2002, Carvalho et al 2007, Tuon et al 2008), sugerindo que o

progresso para um bom prognóstico da doença deve estar associada à indução de mecanismos imunoreguladores.

Além de investigar se os pacientes de cura espontânea apresentam um padrão de resposta imune diferente dos pacientes curados clinicamente após o tratamento, outro foco do trabalho em questão foi verificar se o tempo de cura clínica influencia na expressão gênica de citocinas e fatores transcricionais.

Na leishmaniose, diversos trabalhos têm ressaltado a influência do tempo de cura no padrão de produção de citocinas. Da-Cruz e colaboradores (2002) demonstraram que os níveis de IFN- γ e IL-5 nos pacientes LC e LM detectados após o final do tratamento e longo tempo após a cura eram similares. Castellano e colaboradores (2009) observaram que os níveis de IL-10 e IL-12 provenientes de pacientes curados recentemente de LC, foram maiores quando comparados aos pacientes com longo tempo após a cura. Em relação à resposta humoral, foi observado que pacientes curados recentemente de LC apresentaram maiores níveis de produção de IgG1 e IgG3 quando comparado com pacientes com longo tempo após a cura (Castellano et al 2009).

O presente trabalho demonstrou que pacientes curados recentemente (LCC<2a) apresentaram maior expressão de citocinas com perfil inflamatório (*IL12A* e *IL18*). Possivelmente estes dados devem indicar que apesar destes pacientes estarem clinicamente curados, eles ainda não foram capazes de reestruturar a homeostasia que fora desregulada durante a infecção. Esta resposta encontrada nestes pacientes pode resultar na reativação da doença, visto que o maior número de episódios de reativação ocorre até o período de mais recentes de cura clínica.

Os pacientes com longo tempo após a cura (LCC>2a) parecem apresentar uma maior homeostasia da resposta imune, sendo observados níveis de expressão de citocinas e fatores transcricionais semelhantes até aos dos indivíduos saudáveis.

Em suma, esses dados indicam que os pacientes curados recentemente ainda não foram capazes de reestruturar totalmente o equilíbrio perdido durante a infecção. Adicionalmente, podemos sugerir que este perfil de resposta esteja relacionado com o possível predomínio de células T de memória efetora nestes pacientes.

O perfil de expressão encontrado nos pacientes LCC>2a evidencia um possível “resfriamento” da resposta imune, provavelmente devido à ação da intervenção terapêutica nestes pacientes, visto que a droga utilizada destruiu parte dos parasitos, diminuindo a estimulação antigênica e com isso a expansão de células T antígeno-

específicas. Além disso, acredita-se que com o aumento do tempo de cura, ocorra o desenvolvimento de uma resposta imunoregulada, evidenciado principalmente pelo predomínio de células T de memória central (Zaph et al 2004).

Apesar dos pacientes de CE apresentarem elevada expressão de citocinas e fatores transcricionais relacionados ao perfil tipo 1 e tipo 2, a evolução para um bom prognóstico parece estar associada com a habilidade dessas células de expressarem moléculas capazes de contrabalancear um ambiente inflamatório exacerbado.

Um aspecto importante a ser ressaltado é que citocinas produzidas por uma determinada linhagem de células podem não ser exclusivas a elas. Uma possível explicação para isso é que certas linhagens mantêm a memória de uma determinada citocina, mas ao mesmo tempo têm a capacidade de adquirir a expressão de outras citocinas, se estimuladas sob condições adequadas de polarização. Esta flexibilidade ocorre apenas nos estágios iniciais de diferenciação, enquanto nos estágios mais tardios as células se tornam totalmente comprometidas com uma determinada linhagem (Salustto et al 2009).

Visto que durante uma re-infecção ocorre o desenvolvimento de células T de memória, mas também a ativação de células T virgens, e que nós trabalhamos com um *pool* de mononucleares, esta flexibilidade na polarização das linhagens parece estar bem evidente no nosso trabalho. Sendo assim, é importante ressaltar que a idéia principal do trabalho não foi à identificação fenotípica dos linfócitos, a fim de saber a fonte das citocinas e fatores avaliados, mas tentar compreender o que este conjunto de citocinas produzido no ambiente favorece para o estabelecimento de determinada fase de cura clínica.

Após a análise da expressão de cada gene individualmente, foi avaliada a correlação entre eles, com o objetivo de investigar a expressão simultânea de genes de citocinas e fatores transcricionais com funções sinérgicas e antagônicas, na tentativa de definir um perfil de resposta imune para cada momento da cura clínica destes pacientes. Os resultados demonstraram que os pacientes LCC<2a apresentaram uma resposta desregulada quando comparado aos pacientes LCC>2a. Isto provavelmente ocorre devido ao pouco tempo de cura, que dificulta a modulação e o equilíbrio adequado da resposta imune. Além disso, dados não-publicados do nosso laboratório, têm mostrado que pacientes curados recentemente apresentam um predomínio de células T de memória efetora, o que pode contribuir para uma destruição rápida do parasito, caso as células desses indivíduos encontrem novamente a *Leishmania*, mas também pode

favorecer a destruição tecidual através das atividades citolíticas e re-ativação da doença (Brodskyn et al 1997, Faria et al 2009), corroborando com a idéia de que este período é o mais propício para a ocorrência de episódios de re-ativação.

Adicionalmente, foram avaliadas as correlações nos pacientes LCC>2a, e foi observado que estes indivíduos foram capazes de modular a resposta imune, evidenciado pela expressão concomitante de moléculas inflamatórias, antiinflamatórias e reguladoras nessas amostras. Dessa forma, sabendo que o espaço imunológico é finito, acredita-se que deva existir competição para a sobrevivência de um *pool* de memória. Sendo assim, com o controle da carga parasitária e diminuição da estimulação antigênica, muitas células irão começar a competir pelo antígeno, podendo sofrer apoptose por falta de estímulo (negligência imunológica). Esse processo provavelmente acontece com as células de memória efetora, tornando-se necessário o estabelecimento de um novo tipo de memória, nestes casos a memória central. Baseado nisso, acredita-se que estes pacientes que conseguem desenvolver uma resposta imune harmônica tenham um predomínio de células T de memória central (Wherry et al 2003).

Dados semelhantes foram encontrados para os pacientes de CE, que apesar de terem uma expressão elevada da maioria das citocinas e fatores transcricionais avaliados, são capazes de modular a resposta imune, o que contribui para a manutenção de um prognóstico favorável nestes indivíduos. Acreditam-se também estes pacientes apresentem um predomínio de células T de memória central, devido evidências que estas células possam permanecer mais tempo no organismo pelo fato destas terem telômeros mais longos do que as células T de memória efetora (Sallusto et al 2009).

Os resultados obtidos permitem identificar alguns fatores que contribuam para a manutenção da cura clínica e o controle da infecção na LTA. A observação de citocinas e fatores transcricionais diferentemente expressos entre os grupos estudados abrem novas questões sobre o papel desses mediadores no estabelecimento da cura clínica. Variações genéticas combinadas com fatores epigenéticos pode ser a razão para as diferenças encontradas nos pacientes de CE, e uma possível explicação para a capacidade destes indivíduos conseguirem controlar a infecção, sem a necessidade de intervenção terapêutica. Além disso, o aumento do tempo de cura parece favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune bem modulada, e evitar o surgimento de episódios de reativação, contribuindo assim para o controle da doença.

5. Conclusões

- ✓ O presente estudo mostrou não haver diferença entre os níveis de *TBET* e *GATA3* em relação ao tempo cura da LC, mas os níveis de expressão das citocinas induzidas por estes fatores transcricionais foram mais baixos nos pacientes curados por longo tempo, sugerindo que após o controle da infecção por *Leishmania* ocorre redução paulatina da capacidade destas células serem ativadas pelos antígenos do parasito.
- ✓ O fator transcricional *FOXP3* e a citocina *IL10* foram positivamente correlacionados apenas nos pacientes curados há mais de dois anos, indicando que a associação destas moléculas se dá somente após um longo tempo de estabilidade clínica pós-tratamento.
- ✓ Os pacientes de cura espontânea apresentaram maior expressão de moléculas associadas ao perfil tipo 1, tipo 2 e regulador, o que pode ser um fator que explicaria a maior capacidade destes indivíduos induzirem mecanismos imunes associados ao controle da doença.
- ✓ Este estudo confirmou a importância da análise da expressão gênica de citocinas e fatores transcricionais associados à resposta imune do tipo 1, tipo 2 e reguladora na caracterização do período de cura clínica dos pacientes de leishmaniose cutânea. Estudos prospectivos avaliando a produção de citocinas poderão auxiliar na definição de fatores imunológicos que contribuam para a manutenção da cura clínica na LTA.

6. Referências bibliográficas

Agarwal S, Rao A 1998. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* 9: 765-775.

Amato VS, de Andrade HF, Duarte MI 2003. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop* 85: 39-49.

Avni O, Lee D, Macian F, Szabo SJ, Glimcher LH, Rao A 2002. T(H)cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokines genes. *Nat Immunol* 3: 643-651.

Awasthi A, Kuchroo VK 2009. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 489-498.

Aebischer,T 1994. Recurrent cutaneous leishmaniasis: A role for persistent parasites? *Parasitol Today* 10: 25-28.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 18: 2993-3002.

Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Frucht DM 2003. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 23: 147-161.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro J, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740.

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

Belkaid Y 2003. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opin Biol Ther* 3: 875-885.

Belkaid Y, Rouse BT 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 353-360.

Berman JD 1988. Inhibition of leishmanial protein kinase by antileishmanial drugs. *Am J Trop Med Hyg* 38: 298-303.

Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG 1994. An experimental model of the production of metastases in murine cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol* 80: 93-99.

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

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

Bluestone JA, Abbas AK 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3: 253-257.

Brito MEF, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC 2001. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans T Soc Trop Med Hyg* 95: 203-206.

Brodie TM, Smith MC, Morris RV, Titus RG 2007. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun* 75: 2359-2365.

Brodskyn CI, Barral A, Boaventura V, Carvalho E, Barral-Netto M 1997. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 159: 4467-4473.

Cáceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J 1993. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 91: 500-505.

Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, Goncalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva JS 2006. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 193: 1313-1322.

Carneiro FP, De Magalhães AV, De Jesus Abreu Almeida Couto M, Bocca AL, Muniz-Junqueira MI, Ribeiro Sampaio RN 2009. Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 646-651.

Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JLM, Reed S, Rocha H 1985. Cell mediated immunity in American Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. *The J Immunol* 135: 4144-4148.

Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H 1995. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53: 273-277.

Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado P, de Jesus AR 2007. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis *Parasite Immunol* 29: 251-258.

Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A, Rodrigues V 2009. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol* 70: 383-390.

Castellino F, Germain RN. 2006. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: When, where, and how. *Annu Rev Immunol* 24: 519-540.

Castés M, Agnelli A, Rondon AJ 1983. Characterization of the immune response in American Cutaneous Leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol* 27: 176-186.

Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, Webb J, Scott FW 2003. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J Immunol Methods* 278: 157-169.

Chua AO, Wilkinson VL, Presky DH, Gubler U 1995. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *J Immunol* 155: 4286-4294.

Coler RN, Reed SG 2005. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21: 244-249.

Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, Rondon AJ 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 444-448.

Costa JM, Netto EM, Vale KC, Osaki NK, Tada MS, Marsden PD 1987. Spontaneous healing of cutaneous *Leishmania braziliensis braziliensis* ulcers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81:606

Costa JML, Saldanha ACR, Silva ACM, Serra - Neto A, Galvão CES, Silva CMP, Silva AR 1992. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão. II. Aspectos epidemiológicos e clínico-evolutivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25: 115-123.

Coutinho S, Pirmez C, Mendonça S, Conceição-Silva F, Dórea R 1987. Pathogenesis an immunopathology of leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 214-228.

Convit J, Kerdel-Vegas F 1965. Disseminated cutaneous leishmaniasis. *Archives of Dermatology* 91: 439-447.

Cunningham A 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 72: 132-141.

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG 1994. *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62: 2614-2618.

Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG 1996. Tumor necrosis factor-alpha in human American tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 225-229.

Da-Cruz AM, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho Z, Machado ES, Coutinho SG 2000. Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis* in patients with AIDS-associated American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 569-571.

Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG 2002. T-cell mediated immune response in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 251-256.

Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 697-712.

Damoiseaux J 2006. Regulatory T cells: back to the future. *Neth J Med* 64: 4-9.

Desjeux, P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-315.

De-Souza Neto SM, Carneiro CM, Vieira LQ, Afonso LC 2004. *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 289-294.

Dolganov GM, Woodruff PG, Novikov AA, Zhang Y, Ferrando RE, Szubin R, Fahy JV 2001. A novel method of gene transcript profiling airway biopsy homogenates reveals

increased expression of a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter (NKCC1) in asthmatic subjects. *Genome Res* 11: 1473-1483.

Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 73: 7853-7859.

Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol* 22: 319-331.

Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato V, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto M, Coutinho S, Da-Cruz A 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* 149: 440-444.

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

Grogl M, Thomason TN, Franke ED 1992. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 47: 117-126.

Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 18: 349-356.

Hori S, Nomura T & Sakaguchi S 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.

Kropf P, Herath S, Tewari R, Syed N, Klemenz R, Müller I 2002. Identification of Two Distinct Subpopulations of *Leishmania major*-Specific T Helper 2 Cells. *Infect Immun* 70: 5512-5520.

Kumar R, Bumb RA, Salotra P 2009. Correlation of parasitic load with interleukin-4 response in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 57: 239-246.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* : 1121-1133.

Iwakura Y, Ishigame H 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116: 1218-1222.

Lainson R 1983. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 569-596.

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

Lehn M, Weiser WY, Engelhorn S, Gillis S, Remold HG 1989. IL-4 inhibits H2O2 production and antileishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by IFN-gamma. *J. Immunol* 143: 3020-3024.

Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, Dowd P, Gurney AL, Wood WI 2000. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 773-778.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Lyakh L, Trinchieri G, Provezza L, Carra G, Gerosa F 2008. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. *Immunol Rev* 226: 112-131.

Matos GI, Covas Cde J, Bittar Rde C, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, Amato VS, Oliveira-Neto MP, Mattos Mda S, Pirmez C, Sampaio EP, Moraes MO, Da-Cruz AM 2007. IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis* 24: 7:33.

Mattos MS 2006. O desafio para a realização de ensaios clínicos em leishmaniose tegumentar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 39 (S III): 94-95.

Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Lago EL, Cuba CC, Barreto AC, Costa JM, Jones TC 1984a. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia – Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III. Mucosal disease presentation and initial evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 17: 179-186.

Marsden PD 1986. Mucosal leishmaniasis (“espúndia” Escomel 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 859-876.

Mendonça S, Coutinho S, Amendoeira R, Marzochi M, Pirmez C 1986. Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. *Clin Exp Immunol* 64: 269-276.

Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG 2004. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 189: 1018-1023.

Menezes MJ, Costa DJ, Clarêncio J, Miranda JC, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C, de Oliveira CI 2008. Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. *BMC Immunol* 10: 09-12.

Monteforte GM, Takeda K, Rodriguez-Sosa M, Akira S, David JR, Satoskar AR 2000. Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop Th1 response and control cutaneous *Leishmania major* infection. *J Immunol* 164: 5890-5893.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*16: 311-323

Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, Murphy TL 2000. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* 18:451-494.

Nelms K, Huang H, Ryan J, Keegan A, Paul WE 1998. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biological functions. *Adv Exp Med Biol* 452: 37-43.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C 1997b. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil – an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. *Int J Dermatol* 36: 463-468.

Oliveira-Neto MP 1998. Leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Estudo de 648 casos observados no Hospital Evandro Chagas. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. (Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, vii + 166 pp + 14 anexos).

Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, Gonçalves-Costa SC, Brahim LR, Menezes CR, Pirmez C 2000. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol* 39: 506-514.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.* 18: 293-305.

Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM 1998. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9: 745–755.

Padigel UM, Alexander J, Farrell JP 2003. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol* 171: 3705-3710.

Pai SY, Truitt ML, Ho IC 2004. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1993-1998.

Peters N, Sacks D 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* 213:159-179.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin R 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91: 1265-1266.

Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK, Gubler U 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14002–14007.

Rey L. *Leishmania e leishmaníases: os parasitos*. Parasitologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 214-226.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* : 581-596.

Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM 1998. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 31: 143-148.

Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Correia Filho D, Cruz Filho A, Barral A, Coffman RL, Carvalho EM 1999. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 180: 1731-1734.

Rogers ME, Chance ML, Bates PA 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124: 495-507.

Rouse BT, Suvas S 2004. Regulatory cells and infectious agents: detentes cordiale and contraire. *J Immunol* 173: 2211-221.

Sacks D, Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* mice. *Nat Rev Immunol* 2: 845-858.

Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcaïs A, Argiro L, Dessein A 2008. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* 180: 6139-6148.

Sallusto F, Lanzavecchia A 2009. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* 39: 2076-2082.

Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G Jr, Fernandes O 1998. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis* 178: 911-914.

Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (SVS/MS). Manual da Leishmaniose Tegumentar Americana 2^a ed. [2007/2008]: www.saude.gov.br

Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 423-431.

Shoemaker J, Saraiva M, O'Garra A 2006. GATA-3 directly remodels the IL-10 locus independently of IL-4 in CD4+ T cells. *J Immunol* 176: 3470-3479.

Skapenko A, Leipe J, Niesner U, Devriendt K, Beetz R, Radbruch A, Kalden JR, Lipsky PE, Schulze-Koops H 2004. GATA-3 in human T cell helper type 2 development. *J Exp Med* 2: 423-428.

Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 177:1797-1802.

Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM: Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells 1997. *J Exp Med* 185: 817–824.

Szabo, S. J, S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655–669.

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

Toledo VPCP, Mayrink W, Gollob KJ, Oliveira MAP, da Costa CA, Genaro O, Pinto JA, Afonso LCC 2001. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 89-98.

Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MIS, Neto VA, Amato VS 2008. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clin Immunol* 128:442-446.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* : 1829-1834

Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ, Strober W 2006. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on *IFNG* gene acetylation and transcription. *J Exp Med* 203: 755-766.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: 34.1-34.11.

Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, von Andrian UH, Ahmed R 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 4: 225-234.

Wing K, Sakaguchi S Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity 2010. *Nat Immunol* 11:7-13

World Health Organization (WHO) [2004]: www.who.int

Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K 1998. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 161: 3400-3407.

Zaph C, Uzonna J, Beverley SM, Scott P 2004. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med* 1104-1110.

Zheng W, Flavell RA 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89: 587-596.

Zhou M, Ouyang W 2003. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol Res* 28: 25-37.

Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE 2006. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production,

selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 16: 03-10.