

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico

Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA EM LINFÓCITOS
DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES PORTADORES
DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

RECIFE

2011

Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA EM LINFÓCITOS DO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA.

Dissertação apresentada ao curso de mestrado
em Saúde Pública do Centro de Pesquisa
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

RECIFE

2011

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C355c Castro, Maria Carolina Accioly Brelaz de.
Caracterização imunofenotípica em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana. / Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro. — Recife: M. C. A. B. de Castro, 2011.
82 f.: il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
Orientadora: Valéria Rêgo Alves Pereira.

1. Leishmaniose. 2. Leishmania braziliensis. 3. Imunofenotipagem. 4. Citometria de Fluxo. 5. Linfócitos T . I. Pereira, Valéria Rêgo Alves. II. Título.

CDU 616.993.161

MARIA CAROLINA ACCIOLY BRELAZ DE CASTRO

CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA EM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 15/02/2011

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira (Orientadora)
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes (Revisora/ Titular Interna)
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Patrícia Muniz M. F. Moura (Titular Externo)
Departamento de Patologia- Universidade de Pernambuco (UPE)

Agradecimentos

Aos pacientes portadores de leishmaniose por aceitarem fazer parte deste trabalho.

Aos meus pais, Jalmir e Márcia, pelo eterno carinho, incentivo e compreensão. Vocês são grandes exemplos na minha vida.

A meu irmão, Gabriel, pela sua eterna paciência e por todos os momentos de descontração.

A meu namorado e amor, Eduardo, que me acompanha há anos nessa jornada. Obrigada pelo carinho, apoio e cumplicidade. Obrigada também pelas dicas de informática e de formatação.

A minha orientadora Valéria, pela oportunidade e pelo apoio em todos os momentos de desenvolvimento da dissertação. Sua orientação, amizade e paciência são muito valiosas para mim.

Aos meus tios Márcio, Marcílio, Maurício e Carla pelo carinho e entusiasmo.

A D. Lúcia, pela amizade e cuidados ao longo dos anos.

A toda a equipe do Laboratório de Imunogenética pelos bons momentos e apoio no dia-a-dia. Agradeço, sobretudo, a Andresa Oliveira e a Amanda Almeida, pela ajuda na citometria, amizade, participação e pelos excelentes momentos que vivenciamos. Agradeço também a Karla Luna, Marina Souza e Lucas Rocha pela convivência diária, amizade e apoio nos experimentos.

A Maria Edileuza Brito e ao Núcleo de Vigilância em Saúde e Ambiente do Município de Moreno, principalmente a Cláudio e Lucinha, pelo apoio com os pacientes e com o diagnóstico.

Aos amigos do Mestrado em Saúde Pública, do Departamento de Imunologia e do Aggeu pelos ensinamentos, dicas e convívio diário, que tornaram meus dias mais agradáveis. Agradeço especialmente a Fabiana Gomes, amiga que sempre me incentiva.

A minha querida amiga Juliana Santos, minha irmã do coração e companheira de aventuras por todos esses anos. Obrigada pelo amor, otimismo e confiança.

Também aos queridos amigos Paulyne Figueiredo, Pedro Santos, Maria Wanick, Natália Oikawa e Rafael Rodrigues pela eterna animação, amizade, saídas para descontrair, conversas e incentivos sempre.

As amigas da escola Camila Colares, Talita Souto, Ana Amélia Almeida, Natália Alfaro e Elida Ribeiro cuja amizade de longa data sempre me auxiliou.

Aos amigos de curso de Biomedicina da UFPE: Iana Rafaela, Anacassia, Julliana, Veridiana, Giovanna, Renato, Luís, Jana, Amanda, Thiago “Gaba”, Isabella, Natália, Wheverton, Isabelle, Lívia, Márcia e Adriene pela torcida e companheirismo nesses anos. Um agradecimento especial a Rafael Freitas pela convivência, amizade, tardes no citômetro e dicas de citometria.

Ao Aggeu por fornecer a estrutura e todos os equipamentos que foram necessários durante o desenvolvimento desse trabalho e a Pós Graduação do curso de Saúde Pública pela oportunidade.

Ao CNPq por financiar o meu estudo.

A todos aqueles por ventura não mencionados aqui, mas que contribuíram de alguma maneira para esse trabalho, meus agradecimentos!

The Road Not Taken

“Two roads diverged in a yellow wood,
And sorry I could not travel both
And be one traveler, long I stood
And looked down one as far as I could
To where it bent in the undergrowth;

Then took the other, as just as fair,
And having perhaps the better claim,
Because it was grassy and wanted wear;
Though as for that the passing there
Had worn them really about the same,

And both that morning equally lay
In leaves no step had trodden black.
Oh, I kept the first for another day!
Yet knowing how way leads on to way,
I doubted if I should ever come back.

I shall be telling this with a sigh
Somewhere ages and ages hence:
Two roads diverged in a wood, and I—
I took the one less traveled by,
And that has made all the difference”

Robert Frost

Castro, M. C. A. B. **Caracterização Imunofenotípica em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana.** 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença observada em todo Brasil. Em Pernambuco é incidente em todas as regiões, sendo a *L. (V.) braziliensis* o agente etiológico de maior prevalência. A LTA pode causar desde lesões cutâneas localizadas até lesões mucocutâneas, resultantes da interação parasito-hospedeiro-vetor. A susceptibilidade ou resistência à doença é dependente das respostas de células T, caracterizadas pelo aumento de células T CD4⁺, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2. Já os linfócitos T CD8⁺ estão relacionados com os mecanismos imunoprotetores na LTA. Nesse estudo, os objetivos foram caracterizar imunofenotipicamente os linfócitos T do sangue periférico de 17 pacientes antes do tratamento, 11 após o tratamento e 5 curados espontaneamente. Além disso, caracterizar também a produção das citocinas IL-10, IL-4, TNF- α e IFN- γ em culturas de PBMC após estimulação com as frações antigênica solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. Os resultados mostraram que ambas as frações antigênicas foram capazes de induzir uma resposta imune específica. Não ocorreram modificações significativas no perfil fenotípico *ex vivo* das células T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺; entretanto, células T CD25⁺ se mostraram significativamente aumentadas. Foi observada uma imunossupressão temporária na fase inicial da leishmaniose, com presença significativa das citocinas IL-10 e IL-4 e de células T CD4⁺, sugerindo a sua ligação com a progressão da doença. Após o tratamento ou cura espontânea, o padrão imunológico observado indicou a existência de células T de memória com uma resposta do tipo 1, com produção de TNF- α , IFN- γ e a presença significativa de células T CD4⁺ e CD8⁺. Além disso, a produção significativa de IL-10 nas culturas e o perfil de células T CD25⁺ nos ensaios *ex vivo*, sugere a existência de mecanismos de imunoregulação. Sendo assim, essa resposta das células T após o tratamento ou a cura espontânea parece estar associada com a cura e/ou proteção na LTA.

Palavras-chave: Leishmaniose, *L. (V.) braziliensis*, Imunofenotipagem, Citometria de fluxo, Linfócitos T.

Castro, M. C. A. B. **Immunophenotypic characterization of peripheral blood lymphocytes from patients with American tegumentary.** 2011. Dissertation (Master in Public Health) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

ABSTRACT

The American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a disease observed in all states of Brazil. In Pernambuco, there is an incidence in all regions, with *L. (V.) braziliensis* being the prevalent etiologic agent. ACL can cause from skin localized lesions to mucocutaneous ones, resulting from the host-parasite-vector interactions. The susceptibility or resistance to the disease is dependent on T cell responses, characterized by an increased in the CD4⁺ T cells, showing a Th1 or Th2 profile. CD8⁺ T cells meanwhile are related to immunoprotective mechanisms in ACL. The objectives of this study were to characterize immunophenotypically T lymphocytes from peripheral blood from 17 patients before treatment, 11 after treatment and 5 spontaneously cured. Furthermore, to characterize the cytokine production of IL- 10, IL-4, TNF- α and IFN- γ by PBMC cultures after stimulation with soluble and insoluble antigenic fractions of *L. (V.) braziliensis*. The results showed that both fractions were able to induce a specific immune response. There were no significant changes in the phenotypic profile of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells *ex vivo*, however CD25⁺ T cells were significantly increased. We observed a transitory immunosuppression in the early phase of leishmaniasis, with significant presence of IL-10 and IL-4 and CD4⁺ T cells, suggesting their connection with disease progression. After treatment or spontaneous healing, the immune pattern observed indicates the presence of memory T cells with a type 1 response, with the production of TNF- α , IFN- γ and the significant presence of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Furthermore, immunoregulatory mechanisms were suggested by the existence of CD25⁺ T cells *ex vivo* and by the significant production of IL-10 in cultures. Therefore, this T cell response after treatment or spontaneous healing seems to be associated with cure and / or protection in the ACL.

Key Words: Leishmaniasis, *L. (V.) braziliensis*, Immunophenotyping, Flow cytometry, T Lymphocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição mundial da leishmaniose cutânea.....	14
Quadro 1: Formas clínicas da Leishmaniose, principais espécies responsáveis e localização geográfica.....	15
Figura 2: Formas amastigota e promastigota da <i>Leishmania</i>	16
Figura 3: Ciclo biológico da <i>Leishmania spp</i>.....	17
Figura 4: Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	19
Figura 5: Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	20
Quadro 2: Dose recomendada das drogas de primeira linha para o tratamento da LTA de acordo com a Organização Mundial de Saúde e o Ministério da Saúde do Brasil.....	21
Figura 6: Subtipos de células T e seu papel na ativação macrófaga.....	29
Figura 7: SDS-PAGE de proteínas solúveis (1 e 2) e insolúveis (3 e 4) de <i>L. (V.) braziliensis</i>.	36
Figura 8: Exemplo de gráfico de FSCxSSC em PBMC com delimitação na região linfocitária.	39
Figura 9: Exemplo de gráfico FSC x SSC em sangue periférico com delimitação na região linfocitária.....	39
Figura 10: Exemplo de gráfico de fluorescência (FL1xFL2) utilizado para avaliar o percentual de células T produtoras de citocinas na citometria de fluxo.	40
Figura 11: Percentual de linfócitos no sangue periférico de pacientes com LTA e controles.....	45
Figura 12: Gráfico comparativo do percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com LTA e controles após estimulação com as frações antigênicas solúvel (SOL) e insolúvel (INS) de <i>L. (V.) braziliensis</i> e dos mitógenos fitohemaglutinina (PHA) e acetato de meristato forbol/ ionomicina (IONO).	46
Figura 13: Comparação do percentual de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em ensaios de ex-vivo e cultura de pacientes com LTA e controles.....	47
Figura 14: Gráfico comparativo da produção de citocinas em 4h, 12h e 48h de cultura por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ após estimulação com as frações antigênicas solúvel e insolúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i>.....	48
Figura 15: Percentual de expressão de citocinas em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes com LTA e controles após estimulação com os mitógenos (A) PHA (10µg/ml) e (B) PMA (25 ng/ml) / Iono (1 µg/ml).....	51

Figura 16: Percentual de expressão de citocinas em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes com LTA e controles após estimulação com as frações antigênicas (A) solúvel (1,25µg/ml) e (B) insolúvel (2.25µg/ml) de *L. (V) braziliensis*..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais características do grupo de estudo	42
Tabela 2: Exames laboratoriais, tratamento e ensaios realizados com o grupo de estudo	43
Tabela 3: Percentual de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD25⁺ em linfócitos do sangue periférico de pacientes e controles.	44
Tabela 4: Razão CD4⁺/CD8⁺ em ensaios <i>ex vivo</i> e de cultura de PBMC.....	47
Tabela 5: Razão IFN-γ/IL-10 em culturas de PBMC de pacientes e controles após estimulação com as frações antigênicas de <i>L. (V.) braziliensis</i>.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(V.)	<i>Viannia</i>
AgSol	Fração antigênica solúvel de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>
Ag Ins	Fração antigênica solúvel de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
FL	Canal de Leitura de Fluorescência
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IFI	Reação de imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
mRNA	RNA mensageiro
NK	Células <i>natural-killer</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Acetato de meristato forbol
PMSF	Metil-fenil-fluoreto
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SBF	Soro bovino fetal
SbV	Antimoniais pentavalentes
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
T CD3 ⁺	Linfócito T CD4 ⁺
T CD4 ⁺	Linfócito T CD4 ⁺
T CD8 ⁺	Linfócito T CD8 ⁺
TA	Temperatura Ambiente
TGF- β	Fator beta de crescimento e transformação
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alpha
V.	<i>Viannia</i>
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana	13
1.2 Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana	17
1.3 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	19
1.4 Tratamento e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana	21
1.5 Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana	24
2. JUSTIFICATIVA	30
3. PERGUNTA CONDUTORA	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 Geral	32
4.2 Específicos	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 Tipo de estudo	33
5.2 Processo de seleção da população estudada	33
5.3 Considerações éticas.....	34
5.4 Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes	34
5.5 Obtenção das frações antigênicas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	35
5.6 Perfil eletroforético dos antígenos solúvel e insolúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i>	36
5.7 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico.....	37
5.8 Cultura para imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico e de citocinas intracitoplasmáticas	37
5.9 Ensaio de imunofenotipagem em sangue periférico	38
5.10 Análise dos resultados obtidos na citometria de fluxo	39
5.11 Análise estatística.....	40
6. RESULTADOS	41
6.1 Pacientes e diagnóstico	41
6.2 Percentual de linfócitos CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD25 ⁺ no sangue periférico de pacientes com LTA ativa em ensaios <i>ex vivo</i>	44
6.3 Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ em culturas de PBMC após estímulo <i>in vitro</i> com antígenos e mitógenos.	45
6.4 Comparação do percentual de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ em ensaios de <i>ex vivo</i> x cultura.....	46

6.5 Avaliação dos tempos de cultura para produção das citocinas intracitoplasmáticas (IL-10, IL-4, TNF-α e IFN-γ).	48
6.6 Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de citocinas em culturas de PBMC após estímulo <i>in vitro</i> com mitógeno.	49
6.7 Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de citocinas em culturas de PBMC após estimulação com as frações antigênicas de <i>L. (V.) braziliensis</i>.	51
7 DISCUSSÃO	55
8 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
Apêndice A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente	78
Apêndice B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente menor de 18 anos	79
Apêndice C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle	80
Anexo A- Parecer do Comitê de Ética	81
Anexo B - Prorrogação do parecer do Comitê de Ética	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose é considerada uma doença emergente e re-emergente, com um aumento na sua incidência nas últimas duas décadas. Esse aumento é devido a mudanças ecológicas e no habitat do vetor, causada por desflorestamento, urbanização, migração, conflitos civis, assim como medidas inadequadas de controle dos vetores e reservatórios e emergência de resistência às drogas leishmanicidas (CLEM, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; REITHINGER *et al.*, 2007). É uma doença que afeta principalmente indivíduos de países subdesenvolvidos, onde a população acometida é aquela com menor status sócio-econômico, que possui menor poder político para influenciar as decisões do governo, e uma limitada capacidade de assumir os custos da doença (diagnóstico, hospitalização, tratamento) (DESJEUX, 2004). A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada e a segunda maior doença parasitária no mundo, cuja subnotificação ainda é alarmante com apenas 32 países apresentando notificação obrigatória, entre eles o Brasil (CLEM, 2010; HOLZMULLER *et al.*, 2006).

A leishmaniose tegumentar tem uma prevalência global estimada em 10 milhões de casos, com aproximadamente 1-1,5 milhões de ocorrências a cada ano. No momento a leishmaniose ocorre em 82 países da Europa, África, Ásia e América, e 350 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a doença (Figura 1) (AMEEN, 2010; DESJEUX, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2007). No entanto como muitas infecções não apresentam sintomas ou são mal diagnosticadas, a carga global da leishmaniose tegumentar é provavelmente subestimada (GONZALEZ *et al.*, 2009; REITHINGER *et al.*, 2007).



Figura 1: Distribuição mundial da leishmaniose cutânea.

Fonte: Organização mundial da saúde (2007)

Nota: Os países em azul mais escuro são responsáveis por mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) distribuiu-se amplamente no continente americano, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, a LTA tem sido assinalada em todos os Estados e, de acordo com o Ministério da Saúde, entre os anos de 2000 a 2008 existiu uma média anual de 26.528 mil novos casos (BRASIL, 2007, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Na região Nordeste, a LTA apresenta características eco-epidemiológicas diversas, embora com algumas similaridades intra-regionais. Em Pernambuco, observa-se uma incidência em todas as regiões do Estado, predominantemente na Zona da Mata com mais de 60% do total de casos notificados anualmente. Portanto, constitui uma das afecções que merece maior atenção, devido não somente à magnitude da doença, como pelo risco de ocorrência de deformidades (ANDRADE *et al.*, 2005).

As leishmanias pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, e subgênero *Leishmania* ou *Viannia*, incluindo aproximadamente 20 espécies que diferem em sua distribuição geográfica (BASANO; CAMARGO, 2004; GOTO; LINDOSO, 2010; NEVES, 2005) (Quadro 1). A *Leishmania (Viannia) braziliensis (L. (V.) braziliensis)* é o agente etiológico de maior prevalência no país, apresentando distribuição geográfica em todas as regiões e sendo a principal espécie identificada até o momento em Pernambuco (ANDRADE *et al.*, 2005; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 2009). As infecções

são normalmente realizadas através da picada de flebotomíneos, as infecções sem vetor são raras (ex. acidentes de laboratório). Nas Américas, o gênero *Lutzomyia* é o responsável pela transmissão das leishmanioses, com cerca de 350 espécies catalogadas, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina (BASANO; CAMARGO, 2004; REITHINGER *et al.*, 2007).

Doença Clínica	Espécies de <i>Leishmania</i>	Posição geográfica
Leishmaniose cutânea	Complexo L. tropica: <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (l.) aethiopica</i> ; <i>L. (L.) major</i> .	Velho Mundo
	Complexo L. donovani: <i>L. (L.) donovani</i> ; <i>L. (L.) infantum chagasi</i> .	Velho Mundo
	Complexo L. mexicana: <i>L. (L.) mexicana</i> ; <i>L. (L.) pifanoi</i> ; <i>L. (L.) amazonensis*</i> ; <i>L. (L.) venezuelensis</i> .	Novo Mundo
	Complexo L. braziliensis: <i>L. (V.) peruviana</i> ; <i>L. (V.) braziliensis*</i> ; <i>L. (V.) guyanensis*</i> ; <i>L. (V.) panamensis</i> ; <i>L. (V.) lainsoni*</i> ; <i>L. (V.) naiffi*</i> ; <i>L. (V.) shawi*</i> ; <i>L. (V.) colombiensis</i> .	Novo Mundo
Leishmaniose Mucosa	<i>L. (V.) braziliensis*</i> ; <i>L. (V.) guyanensis*</i> ; <i>L. (V.) panamensis</i> ; <i>L. (L.) amazonensis*</i>	Novo Mundo
Leishmaniose difusa	<i>L. (L.) amazonensis*</i> ; <i>L. (L.) pifanoi</i> ;	Novo Mundo
	<i>L. (l.) aethiopica</i>	Velho Mundo

Quadro 1: Formas clínicas da Leishmaniose, principais espécies responsáveis e localização geográfica.

Fonte: Adaptado de Neves (2005) e Piscopo; Mallia (2006)

Nota: *Espécies encontradas parasitando o homem no Brasil

As *Leishmanias* apresentam-se sob a forma amastigota em seus hospedeiros vertebrados e promastigota em hospedeiro invertebrado e meio de cultura (Figura 2). As formas amastigotas são estruturas arredondadas ou ovaladas sem flagelo, que se alojam nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos. As formas promastigotas são alongadas, com um flagelo livre e longo emergindo do corpo do parasito. São encontradas no tubo digestivo dos flebotomíneos (BASANO; CAMARGO, 2004; NEVES, 2005; ROBERTS, 2006).

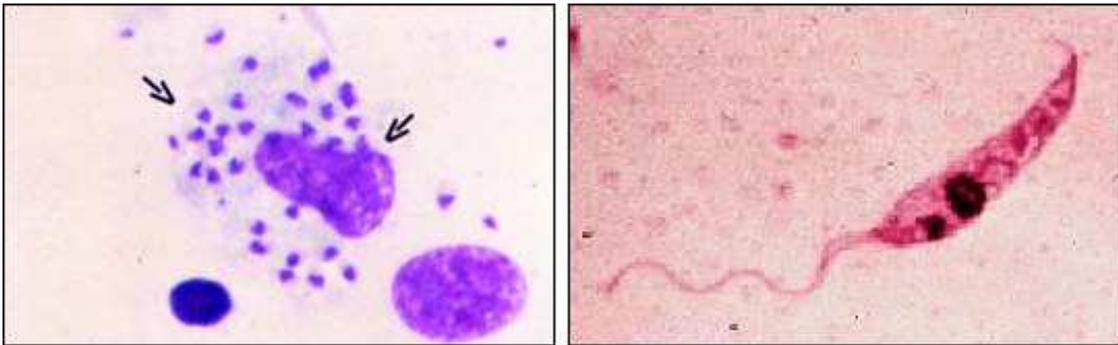


Figura 2: Formas amastigota e promastigota da *Leishmania*

Fonte: Gontijo; Carvalho (2003)

A transmissão para o homem e outros vertebrados ocorre quando as formas promastigotas são inoculadas na derme enquanto o flebotomíneo se alimenta de sangue. Na derme são internalizadas por células fagocitárias onde se transformam em amastigotas. As amastigotas então se replicam até que eventualmente levam ao rompimento das células hospedeiras, sendo novamente fagocitadas. O ciclo continua quando o inseto fêmea ingere o sangue e com ele macrófagos parasitados. No vetor, esses macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas que se transformam em promastigotas e depois em promastigotas metacíclicas no intestino do flebotomíneo. Estas serão inoculadas em um hospedeiro vertebrado no próximo repasto sangüíneo, reiniciando o ciclo (LIPOLDOVÁ *et al.*, 2006; NEVES, 2005) (Figura 3).

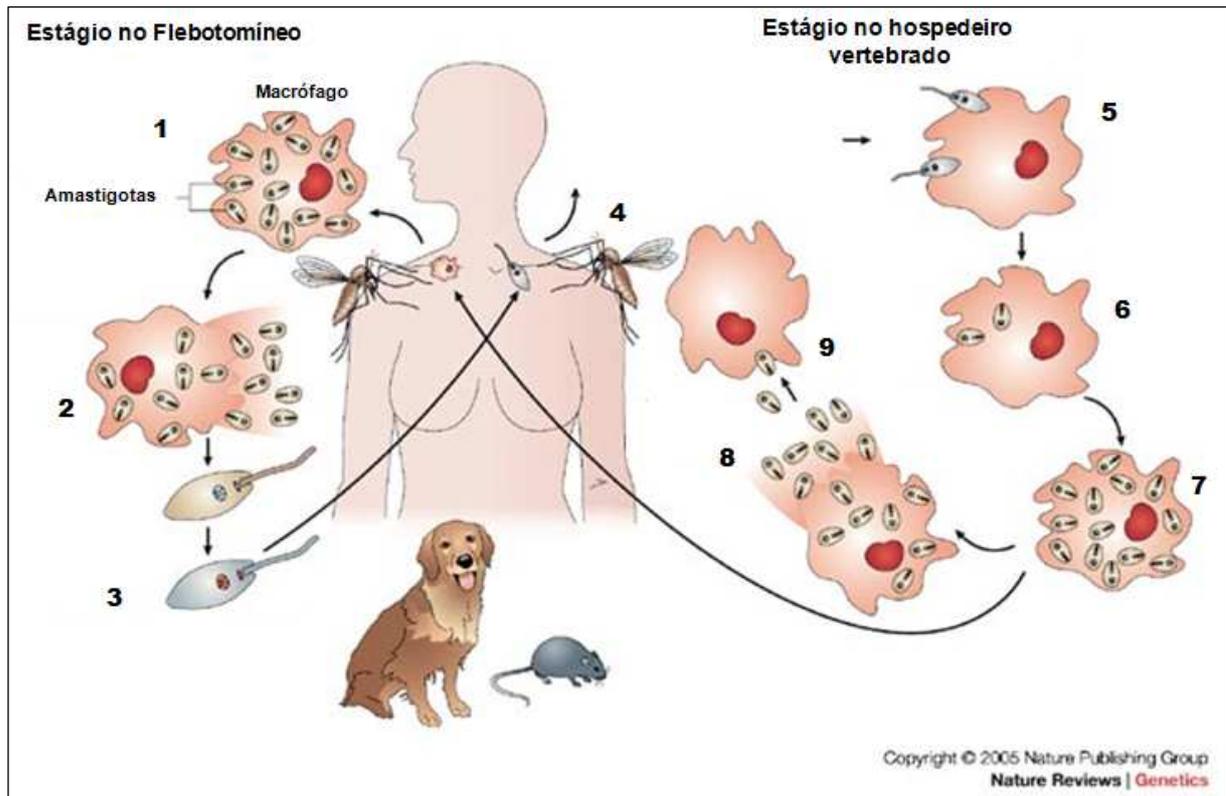


Figura 3: Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Legenda:

- 1) Flebotomíneo fêmea realiza repasto sanguíneo e ingere macrófagos infectados com formas amastigotas;
- 2) Os macrófagos infectados passam para o intestino do flebotomíneo e se transformam em formas promastigotas;
- 3) Os promastigotas se transformam na forma metacíclica infectante;
- 4) Flebotomíneo fêmea infectada realiza repasto sanguíneo e inocula promastigotas na pele;
- 5) Promastigotas são internalizados por células fagocitárias;
- 6) Promastigotas se transformam em amastigotas;
- 7) Os amastigotas se replicam nas células fagocitárias;
- 8) Essa multiplicação eventualmente leva ao rompimento da célula hospedeira
- 9) Infecção de novas células fagocitárias.

Fonte: Adaptado de Lipoldová *et al.* (2006)

1.2 Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

As manifestações clínicas da LTA são variáveis e dependem de características do parasito, do vetor, e do hospedeiro vertebrado, incluindo fatores como a dose e a rota de inoculação das *leishmanias*, e o estado imunológico do hospedeiro. A patogênese está relacionada às interações do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro, assim como ao estado nutricional e fatores genéticos do mesmo. A doença pode variar de formas

assintomáticas até formas cutâneas e mucocutâneas (AMEEN, 2010; CASTELLANO *et al.*, 2009; REITHINGER *et al.*, 2007). As formas cutâneas podem evoluir para cura espontânea e/ou para a forma mais severa, com acometimento de mucosas, sendo relativamente refratária ao tratamento. No entanto, a evolução inicial da doença é semelhante e têm início no ponto de inoculação das formas promastigotas infectantes. Após uma incubação, que geralmente varia de duas semanas até meses, um pequeno nódulo ou pápula eritematosa aparece, algumas vezes acompanhada de linfadenomegalia. A maioria dos pacientes apresenta de 1-2 lesões variando em tamanho e geralmente em áreas expostas do corpo, como pernas e braços. Essa lesão inicial pode se curar espontaneamente ou evoluir, usualmente após alguns meses, para uma doença estabelecida com diferentes formas clínicas onde infecções bacterianas secundárias são comuns (GONZALEZ *et al.*, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006).

As lesões cutâneas apresentam-se nas formas localizada, caracterizada por lesão em áreas expostas do corpo, variando de 1 até 10; disseminada, com numerosas lesões pleomórficas em partes do corpo contínuas ou não, variando em número de 10 à 300; e difusa, forma anérgica da doença caracterizada por lesões nodulares ou papulosas sobre todo o corpo, sendo graves, deformantes e sem cura clínica. Já a leishmaniose mucocutânea, forma mais agressiva e mutilante, apresenta lesões infiltrativas, com ulcerações e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe e laringe (GOTO; LINDOSO, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006) (Figura 4).



Figura 4: Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

A) forma cutânea localizada; B) forma cutânea disseminada; C) forma cutânea difusa; D) forma mucocutânea.

Fonte: Figura A, Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana (2007); Figura B: SOUSA (2006); C: MEHTA *et al* (2009); Figura D: CHAPPUIS *et al* (2007).

1.3 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

O diagnóstico da LTA envolve a associação de aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (Figura 5). O diagnóstico clínico é feito com base nas características da lesão associadas à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. Em todos os casos, no entanto, é desejável um diagnóstico através da confirmação da presença do agente etiológico em amostras obtidas do paciente.

O diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente na pesquisa de parasitos através do exame histopatológico, da pesquisa direta e/ou “*imprint*” para identificar amastigotas, a cultura *in vitro* e *in vivo* para identificação e caracterização da espécie de *Leishmania*, e reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA parasitário. Também são realizados testes sorológicos, que proporcionam parâmetros indiretos para o diagnóstico, que incluem a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA e Western Blot para detecção de anticorpos circulantes específicos contra antígenos parasitários. Estas, em geral, apresentam resultados satisfatórios. Para o diagnóstico laboratorial utiliza-se ainda a Intradermorreação de

Montenegro (IDRM) na avaliação da imunidade mediada por células. A IDRM é considerada positiva quando se observa uma endureção local maior ou igual a 5 mm após 48-72 horas de inoculação do antígeno de *leishmania* no antebraço do paciente. Esse é um teste útil para estudos epidemiológicos e para determinar prevalência da infecção em uma região (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010).

Recentemente foi descrito por Rocha *et al.* (2006) o uso da citometria de fluxo como técnica de diagnóstico sorológico. O grupo destaca que a técnica permite a análise quantitativa dos anticorpos, sendo o procedimento útil no diagnóstico da leishmaniose cutânea ativa, além de ser uma ferramenta sorológica adicional na discriminação entre leishmaniose localizada, leishmaniose visceral e doenças de Chagas em áreas onde essas co-existem.

É importante destacar a necessidade de se fazer o diagnóstico da leishmaniose, dado o seu amplo espectro de sintomas que se confundem com outras doenças. O diagnóstico diferencial deve ser feito para: esporotricose, infecção cutânea por *Mycobacterium*, úlceras traumáticas ou estase venosa, blastomicose, sarcoidose, sífilis, sarcoma de Kaposi, lepra, cromoblastomicose, anemia falciforme, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, linfoma de células B cutâneas, queratose seborréica, pioderma gangrenoso e infecções piogênicas da pele (GOTO; LINDOSO, 2010).

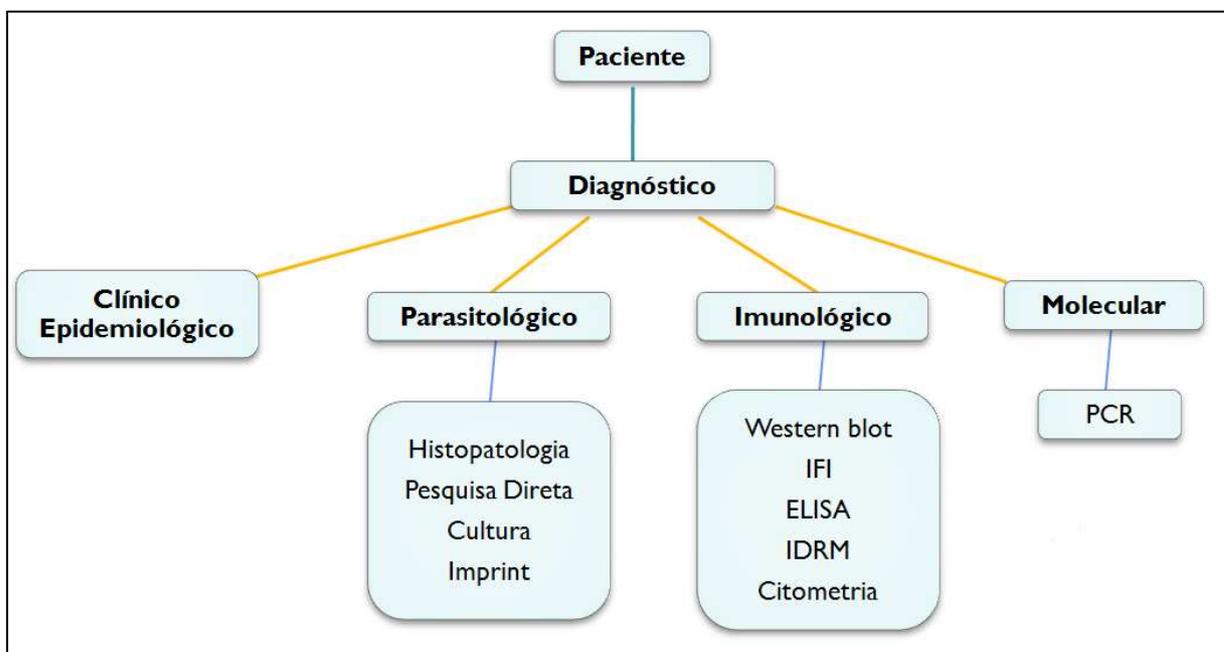


Figura 5: Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

1.4 Tratamento e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana

Embora a doença não seja fatal na maioria dos casos, o tratamento de leishmaniose cutânea é feito para acelerar a cura, para reduzir a cicatriz, especialmente em locais cosméticos (como a face), e para prevenir a disseminação da doença e sua evolução para formas mucosas. O objetivo da quimioterapia com a cicatrização das lesões é a eliminação dos parasitos através da sua destruição direta ou aumento da capacidade do hospedeiro em cicatrizar, onde a resposta imune é a chave para o sucesso. O tratamento para leishmaniose é feito desde o início do século XX, mas apenas poucas drogas estão disponíveis para uso. Os antimoniais pentavalentes (Sbv) são as drogas de primeira escolha recomendadas para tratar LTA causada por diferentes espécies, estando disponíveis em duas formulações: antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®) (CROFT *et al.*, 2006; REITHINGER *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS) fornece recomendações para o tratamento de leishmaniose, mas países como o Brasil adotam diferentes políticas (Quadro 2).

Forma Clínica	Antimonial Pentavalente		Anfotericina B		Pentamidina	
	OMS	Brasil	OMS	Brasil	OMS	Brasil
LCL	20 mg/kg/dia por 20 dias	10-20 mg/kg/dia (15 mg/kg/dia) por 20 dias	ND	1mg/kg/dia Dose total: 1-1.5 g	4mg/kg/dia	4mg/kg/dia Dose total máxima: 2 g
LCD	20 mg/kg/dia por 20 dias	10-20 mg/kg/dia por 20 dias	ND	1mg/kg/dia Dose total: 1-1.5 g	ND	4mg/kg/dia Dose total máxima: 2 g
LD	20 mg/kg/dia por 20 dias	20 mg/kg/dia por 20 dias	ND	1mg/kg/dia Dose total: 1-1.5 g	ND	ND
LM	ND	10-20 mg/kg/dia por 20 dias	ND	1mg/kg/dia Dose total: 2.5-3 g	ND	4mg/kg/dia Dose total máxima: 2 g

Quadro 2: Dose recomendada das drogas de primeira linha para o tratamento da LTA de acordo com a Organização Mundial de Saúde e o Ministério da Saúde do Brasil.

Fonte: Goto; Lindoso (2010)

Legenda: LCL= Leishmaniose Cutânea Localizada/ LCD= Leishmaniose Cutânea Disseminada/ LD= Leishmaniose Difusa/ LM= Leishmaniose Mucosa/ ND= Não determinado

O tratamento no Brasil é realizado através de quimioterapia com antimoniais pentavalentes, cuja droga de primeira escolha é o Glucantime®. As drogas de segunda escolha são a anfotericina B e a Pentamidina (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003;

SANTOS *et al.*, 2008). Entretanto, em caso de gestantes, a anfotericina B é considerada a droga de primeira escolha para o tratamento da LTA (BRASIL, 2007)

Os Sbv, administrados através de injeções intramusculares, são drogas consideradas leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, são inibidos através da redução do Sbv a sua forma trivalente (Sb(III)) ativa, embora não se saiba ao certo o mecanismo ou local dessa redução (BRASIL, 2007; CROFT *et al.*, 2006). A anfotericina B é um antibiótico poliênico que tem alta afinidade para o ergosterol, o esterol predominante em micróbios. É administrado por via endovenosa e diferenças na sensibilidade das espécies de *leishmania* ao tratamento podem ser esperadas devido ao tipo e quantidade de esterol nas membranas dos parasitos (BRASIL, 2007; CROFT *et al.*, 2006). Já a pentamidina, tem mecanismos de ação não claramente definidos, mas estudos sugerem inibição da biossíntese de poliaminas, ligação ao DNA e efeito no potencial de membrana das mitocôndrias (CROFT *et al.*, 2006).

A eficácia do tratamento envolve fatores como: tipo de *Leishmania* spp. infectante e o seu subtipo; fatores do hospedeiro, como localização e cronicidade das lesões; presença de infecções concomitantes; e o protocolo experimental de avaliação utilizado nos estudos, dado que os critérios de cura variam de acordo com o grupo/país de estudo (REINTHINGER *et al.*, 2007). Assim como lesões cutâneas podem curar-se espontaneamente ou responder bem ao tratamento, as mesmas podem, embora com menos frequência, tornar-se resistentes à quimioterapia. Sendo assim, fatores que podem vir a influenciar a escolha e a eficácia do tratamento são: falhas terapêuticas anteriores, disponibilidade local das drogas, custo dos medicamentos, localização e quantidade de lesões e potencial para disseminação (AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010).

Os efeitos colaterais dos tratamentos são variáveis, e usualmente reversíveis. Eles compreendem dores musculoesqueléticas, artralgia, anorexia, náusea, vômito, dores de cabeça, febre, urticária, tosse, leucopenia leve, trombocitopenia entre outros. Efeitos colaterais mais severos incluem pancreatite, falência renal, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade. Todos esses efeitos limitam o uso das drogas em diversos grupos de pacientes, incluindo crianças pequenas, idosos, pacientes grávidas, pacientes com problemas hepáticos, renais e aqueles com outras doenças crônicas. Sendo assim, estudo para o desenvolvimento de novos fármacos candidatos à terapêutica e para o desenvolvimento de vacinas são muito importantes, dada as dificuldades encontradas no tratamento, como a via de administração da droga (geralmente parenteral, o que favorece a evasão pelos pacientes), efeitos colaterais, toxicidades e o

aumento da resistência às drogas existentes (GONZALEZ *et al.*, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010; KEDZIERSKI, 2010; REINTHINGER *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008)

Atualmente existem também outras linhas de tratamento, com drogas alternativas como a Miltefosina, originalmente utilizada para tratar câncer, e que vem sendo utilizada para tratar a LTA com relativo sucesso (CROFT *et al.*, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; SANTOS *et al.*, 2008). Alguns estudos também demonstram a importância do fluconazol, cetoconazol, itraconazol e outros agentes antifúngicos, para o tratamento da leishmaniose, mas ainda com resultados controversos (CROFT *et al.*, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006). Outros autores relatam a utilização de paramomicina, azitromicina, antibióticos tópicos, do imunomodulador tópico imiquimod, e do antimonial intralesional, cujas eficácias variam amplamente (AMEEN, 2010; CROFT *et al.*, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006; SANTOS *et al.*, 2008). Por fim, sabe-se que as formas promastigotas de *Leishmania* são termosensíveis e, por isso, o tratamento com frio/calor vem sendo empregados, utilizando técnicas como lâmpadas infravermelhas ou com luz ultravioleta, e/ou crio cirurgias com CO₂ ou nitrogênio líquido (AMEEN, 2010; CROFT *et al.*, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006). Todos esses estudos ainda precisam de maiores investigações para assegurar sua eficácia e eficiência (AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006; SANTOS *et al.*, 2008).

O critério de cura considerado pelo Ministério da Saúde na LTA é clínico e baseado na completa cicatrização das lesões ulceradas com sua epitalização e regressão total do infiltrado celular. É recomendado que seja feito o acompanhamento mensal do paciente por 3 meses consecutivos após a conclusão do esquema terapêutico. Casos que não cumprem integralmente os parâmetros acima devem ser mantidos em observação por 6 meses (BRASIL, 2007). A resolução da doença resulta em uma cicatriz permanente e característica que, dependendo do tamanho e localização, podem causar trauma significativo no indivíduo afetado (REINTHINGER *et al.*, 2007). Após a cura clínica, deve-se acompanhar o paciente até completar 12 meses após o tratamento (BRASIL, 2007). A cicatrização geralmente confere ao indivíduo proteção contra re-infecção, podendo essa ser restrita ou não a mesma espécie de *Leishmania* spp. Há casos que se curam espontaneamente, algumas vezes com uma evolução clínica inferior a três meses de infecção. Sendo assim, é particularmente relevante o estudo dos mesmos, já que é sugerido que eles desenvolvam resposta imune protetora (BRASIL, 2007; BRITO *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 1995; REINTHINGER *et al.*, 2007;).

É necessário o estudo de novos antígenos potencialmente candidatos a vacina e imunoprolifáticos, sendo essa idéia originária da observação de que pacientes que se

recuperam da leishmaniose apresentam uma sólida imunidade contra re-infecção (AMEEN, 2010; ROBERTS, 2006). Estudos da resposta imune celular na LTA, antes e após o tratamento quimioterápico, foram realizados utilizando-se extratos brutos, solúveis e insolúveis, além de moléculas individuais na tentativa de contribuir para identificação de novas moléculas imunogênicas do parasito (ANTONELLI *et al.*, 2004; DA-CRUZ *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2009; TELINO *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2001). No entanto, testes em humanos com parasitos mortos e proteínas recombinantes resultaram em apenas imunidade de curta duração (SCHRIEFER *et al.*, 2008). No momento, apenas a vacina Leish-111f está em fase de testes clínicos, tendo concluído a fase I e II (segurança e imunogenicidade) no Brasil, Peru e Colômbia e as fases I e II está sendo conduzida na Índia (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00121849>; KEDZIERSKI, 2010). Apesar dos avanços e promessas, principalmente em modelos animais, ainda não se tem disponível uma vacina humana (KEDZIERSKI, 2010; NYLEN; GAUTAM, 2010; ROBERTS, 2006).

O controle da LTA deve envolver estratégias distintas que incluem: vigilância epidemiológica, com identificação dos casos e tratamento; medidas de atuação na cadeia de transmissão impedindo a infecção de vetores e hospedeiros; medidas educativas, incluindo a utilização de proteção individual e distanciamento das construções em relação à mata; medidas administrativas, como saneamento e melhorias das condições habitacionais, além de melhor capacitação dos profissionais de saúde; e por fim o desenvolvimento de uma vacina eficiente e operacional (BASANO; CAMARGO, 2004; DESJEUX, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010; NEVES, 2005).

1.5 Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana

A maior parte dos conhecimentos de imunologia na LTA, sobretudo em relação à interação parasito-hospedeiro são provenientes dos estudos de infecções em modelos animais. Estudos usando camundongos, principalmente infectados com *L. major*, mostraram que a resposta imune mediada por células T desempenha um papel importante na evolução da infecção para a cura ou progressão da doença (CHOI; KROPF, 2009; KEDZIERSKI, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006). Muitas linhagens de camundongos resistentes, como C57BL/6, CBA, C3H, desenvolvem uma doença auto-limitada quando infectadas com *L. major* ou *L.*

tropica, enquanto linhagens susceptíveis, como BALB/c, apresentam uma doença progressiva e severa (REIS *et al.*, 2006; ROBERTS, 2006).

Entretanto, a resposta imune mediada por células T na infecção por *L. (V.) braziliensis* é pouco caracterizada. Isso ocorre devido à dificuldade de crescimento *in vitro* desta espécie, sua ineficiente conversão a formas infectantes e a resistência natural de muitas linhagens de camundongos frente à infecção, sendo necessária uma grande carga parasitária para realizá-la (MOURA *et al.*, 2005). Portanto, a dificuldade em estabelecer modelos animais adequados para se estudar a *L. (V.) braziliensis*, assim como a dificuldade em extrapolar e interpretar resultados obtidos em modelos animais para humanos, dada às diferentes complexidades dos sistemas, contribuiu para o surgimento de estudos com pacientes (GOLLOB *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2006).

Grande importância tem sido dada aos eventos iniciais da resposta imune na LTA experimental, com destaque ao papel da imunidade inata no direcionamento da imunidade adaptativa (KEDZIERSKI, 2010; STENGER, RÖLLINGHOFF, 2001). Estudos indicam os neutrófilos como uma das primeiras células a chegar ao local da infecção e a serem infectadas pelas *leishmanias*. Os neutrófilos podem ser considerados os “cavalos de tróia” para as formas promastigotas metacíclicas, uma vez que facilitam a infecção dos macrófagos. Além disso, contribuem para o processo inflamatório e atividade parasiticida em lesões ativas (NYLEEN; GAUTAM, 2010; PETERS *et al.*, 2008). Já os macrófagos agem como células efetoras, por possuírem potente função antimicrobiana. No entanto também são as células fundamentais para que a infecção se estabeleça, pois são as principais células infectadas e o local de replicação dos amastigotas (JOHN; HUNTER, 2008; NYLEEN; GAUTAM, 2010).

Os parasitos desenvolveram mecanismos para evitar a ativação macrófágica e também o seu reconhecimento pelos linfócitos T. Esses mecanismos incluem a entrada “silenciosa” utilizando receptores como o CR1 (CD35) ou o da fosfatidilserina; inibição direta da função dos macrófagos por interferir na fusão do fagolisossomo-endossomo; diminuição da expressão do MHC classe II, inibição de citocinas como IL-12 e estímulo para produção de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β (CUNNINGHAM, 2002; JOHN; HUNTER, 2008; KEDZIERSKI, 2010; NYLEEN; GAUTAM, 2010). Um importante componente para ligação da resposta imune inata e adaptativa são as células dendríticas. Elas são as responsáveis pelo reconhecimento da infecção parasitária e apresentação celular dos parasitos e/ou seus antígenos, e sua produção inicial de IL-12 é essencial para o início de uma resposta imune protetora em camundongos (JOHN; HUNTER, 2008; KEDZIERSKI, 2010; NYLEEN; GAUTAM, 2010).

Sendo assim, células da imunidade inata, como os granulócitos, macrófagos e células dendríticas, secretam citocinas e quimiocinas, resultando em um microambiente favorável ao direcionamento da diferenciação das células T presentes nos linfonodos proximais ou na corrente sanguínea, para células do tipo 1, com papel protetor, ou tipo 2 associado ao fenótipo de susceptibilidade (STENGER; RÖLLINGHOFF, 2001). Junto com os fagócitos, as células NK representam a primeira linha de defesa contra os patógenos através da via citolítica e também da produção de citocinas pro-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α (NYLEEN; GAUTAM, 2010; PINHEIRO, 2004).

Os linfócitos T são fundamentais na resposta do hospedeiro a LTA: eles são decisivos para cura e geração de uma resposta imune protetora ao mesmo tempo em que são responsáveis pela persistência da doença e a sua patologia (CHOI; KROPPF, 2009). Sendo assim, em todas as formas de LTA, a susceptibilidade ou resistência à doença é dependente das respostas das células T. Essa resposta é caracterizada pelo aumento de células T CD4⁺, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (BACELLAR *et al.*, 2002; KEDZIERSKI, 2010; REIS *et al.*, 2006). Na leishmaniose humana, o padrão de resposta imune do tipo 1 com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12, tem sido associado com o controle da infecção por ativação macrófágica e destruição parasitária (AMEEN, 2010; ROBERTS, 2006). A citocina IFN- γ atua em sinergia com TNF- α ativando óxido nítrico sintase (iNOS ou NOS2) a produzir óxido nítrico (NO), resultando na morte intracelular do parasito e controle da doença (BOGDAN *et al.*, 2000; NYLEEN; GAUTAM, 2010;). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β , consideradas do tipo 2, favorecem a multiplicação parasitária, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ (GOMES-SILVA *et al.*, 2007). Essas citocinas também são capazes de inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1 e sua conseqüente produção de IFN- γ e TNF- α (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007). Apesar de válido em vários aspectos, o paradigma Th1/Th2 é um modelo simplificado, que precisa de revisão, dado que hoje em dia existem outros subtipos de células T, como células T regulatórias e células Th17 que também parecem apresentar papel importante na susceptibilidade e resistência a LTA (GOLLOB *et al.*, 2008; KEDZIERSKI, 2010; NYLÉN; GAUTAM, 2010).

Estudos recentes têm evidenciado o novo subtipo celular conhecido como Th17, relacionado com a produção de IL-17, IL-22, IL21, IL-27 e IL-6, a princípio envolvido com a patogênese de doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes (BETTELLI *et al.*, 2008; OUKKA, 2007; SCHMIDT-WEBER *et al.*, 2007; STOCKINGER; VELDHÖEN, 2007). IL-

IL-17 aumenta a produção de múltiplos mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF- α e NOS2. Bacellar *et al.* (2009) demonstraram a produção de IL-17 durante a infecção por *L. (V.) braziliensis*, além de correlação direta entre esta citocina e TNF- α , indicando o possível envolvimento de IL-17 no progresso da LTA. Sendo assim, a resposta Th17 surge provavelmente como uma resposta inicial a um grande número de patógenos que não são bem resolvidos pela resposta do tipo Th1 e que requerem inflamação tecidual mais exacerbada para serem eliminados. As células Th17 podem preencher a lacuna entre a resposta imune inata e adaptativa, e atrair outros tipos de células para o sítio de infecção em estágios mais tardios do processo inflamatório (BETTELLI *et al.* 2008).

Além as células Th17, existem poucos estudos disponíveis na literatura em relação ao papel de células T regulatórias (Treg), que parecem estar envolvidas na tolerância imunológica durante a infecção humana com *Leishmania*. Elas têm um fenótipo específico (CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺), e diferentes tipos de células Treg já foram descritas, com dois subtipos principais: Tregs naturais (nTregs) e Tregs induzidas (Tr1, Th3 entre outras) (BELKAID, 2007; NYLÉN; GAUTAM, 2010). Células Treg com funções imunossupressoras foram claramente identificadas em lesões de pele de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis*, mas seu papel exato na patogênese não foi completamente avaliado (BOURREAU *et al.*, 2009). Recentemente, Salhi *et al* (2008) identificaram células Treg em PBMC de pacientes com leishmaniose cutânea localizada ativa e curados espontaneamente devido a *L. (V.) braziliensis*. Evidências indicando que as nTregs poderiam estar também envolvidas no controle da imunidade anti-infecção são provenientes de estudos em diversos modelos de infecção por *Leishmania*, *Plasmodium* e *Schistosoma* (BELKAID *et al.*, 2002, 2007). Sendo assim, em alguns casos, nTregs podem controlar o tênue balanço que é algumas vezes estabelecido entre o patógeno e o hospedeiro, e conseqüentemente medeiam um equilíbrio que pode se tornar mutuamente benéfico. Porém, não há uma boa demonstração direta do papel de nTregs nas infecções humanas.

Em relação a resposta imune humoral na LTA, esta é pouco caracterizada, dado que o controle da infecção está relacionado a uma resposta por células T e a correta ativação macrofágica. A intensidade da resposta humoral parece estar relacionada com a carga parasitária e com a cronicidade da infecção. Podem ser observados altos títulos de anticorpos em todas as manifestações clínicas da LTA (TRUJILLO *et al.*, 1999). Alguns estudos já demonstraram a produção de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 associados a uma resposta Th1, enquanto que o subtipo IgG4 estava associado a uma resposta Th2. Pacientes com um maior tempo de evolução da doença apresentam altos níveis de IgE e em pacientes com a forma

mucocutânea, os níveis de IgA se mostram aumentados (O'NEIL *et al.*, 1993). Entretanto, o papel específico dos subtipos na imunidade contra *Leishmania* não está completamente elucidado, mas tem sido útil para o diagnóstico e para prever *in vivo* a resposta imune celular (CASTELLANO *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2005; TRUJILLO *et al.*, 1999).

É importante ressaltar que o sistema imune é composto por subtipos fenotipicamente e funcionalmente distintos, e a investigação dos mesmos é necessária para entender os mecanismos imunológicos de proteção e doença. Nesse contexto, estudos imunofenotípicos têm sido associados com os eventos de resistência e susceptibilidade a LTA (BOTTREL *et al.*, 2001; DA-CRUZ *et al.*, 1994; KEMP *et al.*, 1992). Através de identificação desses subtipos, pode-se especificamente enumerar e caracterizar aqueles que são cruciais em cada etapa de uma infecção (DE ROSAL *et al.*, 2003). Células T CD4⁺ e CD8⁺ atuam como fonte produtora de citocinas envolvidas no processo de ativação de macrófagos (DA-CRUZ *et al.*, 2002). Normalmente se observa uma predominância de linfócitos T CD4⁺ em pacientes com LTA ativa e diferentes grupos (COUTINHO *et al.*, 2002; DA-CRUZ *et al.*, 2002) propuseram que no processo de cura após terapêutica é importante um balanço entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, onde os linfócitos T CD4⁺ teriam suas proporções reduzidas. Trabalhos sugerem a hipótese que linfócitos T CD8⁺ estão envolvidos em mecanismos imunoprotetores na LTA e com o estabelecimento de um padrão do tipo 1, com produção de IFN- γ , sendo uma célula importante para o processo de resistência e cura da doença (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; GOLLOB *et al.*, 2008; KEDZIERSKI, 2010; MENDONÇA *et al.*, 1995). Embora a resposta Th1 seja importante para o controle da infecção, vale ressaltar que citocinas Th1 podem também estar relacionadas com a patogênese da doença. Já foi demonstrado que é necessária a existência de um contrabalanço com as células produtoras de citocinas do tipo Th2, e não uma polarização para um tipo de resposta, pois esses mecanismos são importantes para manter a integridade tecidual do hospedeiro contra uma subsequente resposta inflamatória (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2006). A Figura 6 ilustra os diferentes subtipos de células T e seus papéis para ativação/inibição macrofágica.

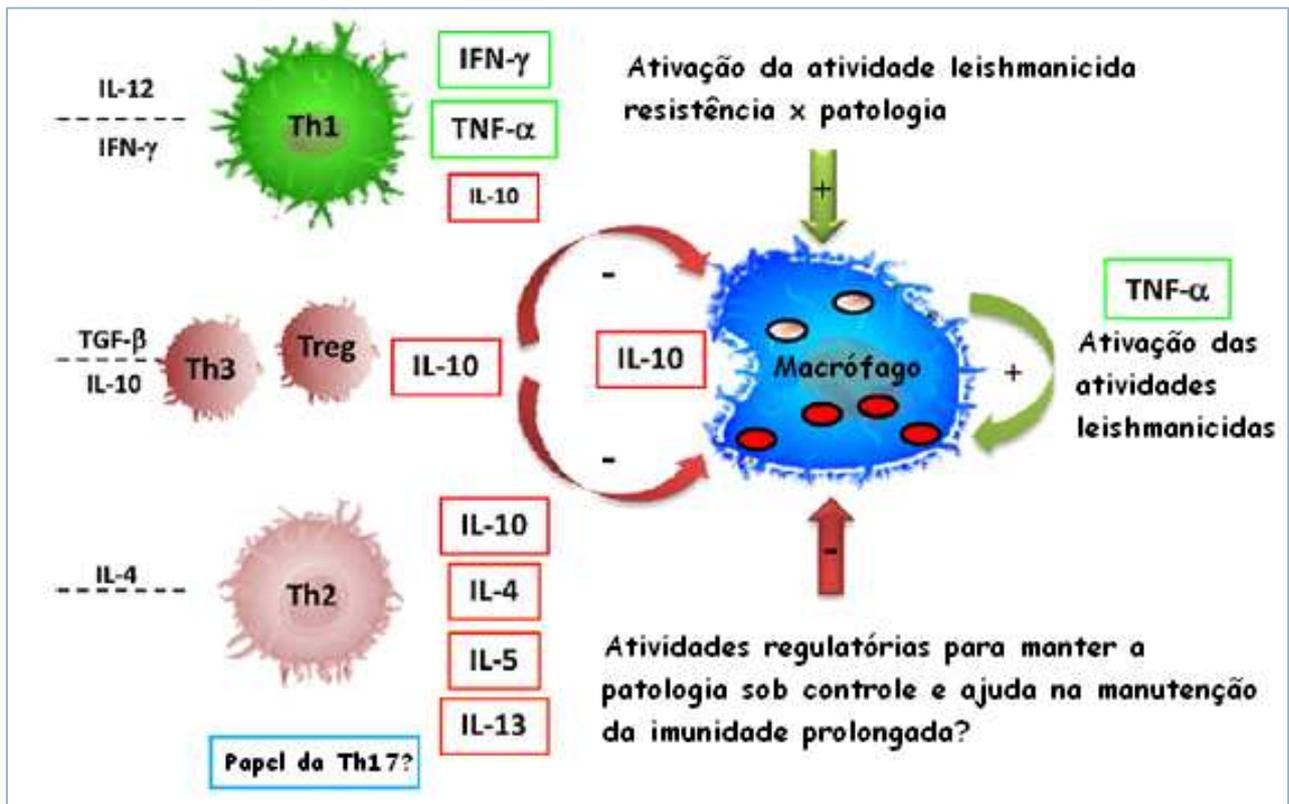


Figura 6: Subtipos de células T e seu papel na ativação macrófagica

Fonte: Modificado de Gollob *et al.* (2008)

Um dos grandes desafios dos pesquisadores é a identificação de marcadores imunológicos e moleculares que permitam compreender não apenas processos que levam a formação da lesão na LTA, como também os mecanismos responsáveis pela resistência à doença. A diversidade de mecanismos imunes e citocinas relacionadas à resposta imunológica na LTA destacam a sua complexidade. Sendo assim, a abordagem apropriada de intervenções imunológicas na leishmaniose e outras doenças requer que sejam determinadas a fonte celular de citocinas e a contribuição de populações celulares individuais para o ambiente geral dessas citocinas durante uma reposta imunológica (BOTTREL *et al.*, 2001). Nesse trabalho examinamos o balanço de células T CD4⁺ e T CD8⁺ e seu perfil de citocinas intracelulares após estimulação mitogênica e com as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* em pacientes com a doença ativa e após cura clínica, além de em indivíduos curados espontaneamente e controles. Além disso, investigamos o percentual de células T (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD25⁺) no sangue periférico dos mesmos.

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença negligenciada, que acomete principalmente pessoas de países subdesenvolvidos, e cujo aumento na incidência vem sendo observado nas últimas décadas (CLEM, 2010; DESJEUX, 2004; REITHINGER *et al.*, 2007). Na realidade nacional e estadual, a LTA também representa um problema de saúde pública. Na leishmaniose humana dados sugerem uma associação entre o padrão de citocinas produzidas por células T específicas ao parasito e o curso da infecção, parecendo que a resposta do tipo 1 seja protetora, enquanto que o tipo 2 favorece a progressão da doença (AMEEN, 2010; GOMES-SILVA *et al.*, 2007). Células T CD4⁺ e T CD8⁺ agem com fontes produtoras de citocinas envolvidas no processo de ativação macrofágica, enquanto linfócitos CD25⁺ foram associados com a supressão da resposta imunológica por células T efetoras (BELKAID, 2007; DA CRUZ *et al.*, 2002; NYLEEN; GAUTAM, 2010). A fim de contribuir para o entendimento dos mecanismos imunológicos em pacientes com LTA, o presente projeto buscou estabelecer um perfil imunológico preditor da progressão ou não da patologia em indivíduos com diferentes formas clínicas da LTA. Em Pernambuco, onde a doença é endêmica e tem alta prevalência, estudo similar ainda não foi realizado.

3. PERGUNTA CONDUTORA

Qual o perfil dos linfócitos T e de suas citocinas nas formas clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana?

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Caracterizar imunofenotipicamente linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana ativa e após a cura clínica através da citometria de fluxo.

4.2 Específicos

- a) Caracterizar os pacientes desse estudo quanto aos aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais;
- b) Identificar nas PBMCs dos pacientes, as populações celulares (linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺) responsáveis pela expressão das citocinas intracitoplasmáticas IL-10, TNF- α , IL-4 e IFN- γ frente ao estímulo *in vitro* com as frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis*;
- c) Verificar a percentagem de linfócitos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD25⁺ no sangue periférico dos pacientes;
- d) Associar o perfil fenotípico celular e a produção de citocinas com as formas clínicas dos pacientes avaliados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Tipo de estudo

O estudo foi do tipo experimental ou ensaio clínico não-randomizado. Foram realizadas comparações entre um grupo de participantes sujeitos a tratamento para LTA, outro grupo de participantes que obtiveram cura espontânea da doença e outro formado por sujeitos sem história prévia de LTA, denominado controle. Todos foram escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

5.2 Processo de seleção da população estudada

Os pacientes do presente estudo foram procedentes de Moreno, Jaboatão dos Guararapes (Região Metropolitana de Recife) e Vicência (Zona da Mata Pernambucana), áreas endêmica da LTA em Pernambuco. Foram selecionados três grupos de pacientes: portadores de lesões ativas (n=17), apresentando seu primeiro caso de leishmaniose e com idade superior a 15 anos; 11 destes com cura clínica após 6 meses de tratamento; e 5 pacientes após cura clínica espontânea, ou seja, sem a realização de tratamento quimioterápico. Para a seleção de pacientes com LTA ativa, foram observados os seguintes critérios: apresentação de uma ou mais lesões cutâneas ativas e ausência de tratamento quimioterápico prévio. Todos os pacientes tiveram o diagnóstico confirmado pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do CPqAM (SRL), estando os exames laboratoriais descritos no item 5.4. Os pacientes receberam atendimento no ambulatório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), onde foram esclarecidos do objetivo do estudo e foram acompanhados para realização de procedimentos para coleta de 40 ml de sangue antes e após tratamento quimioterápico com Glucantime[®] (antimoniato de N-metilglucamina), ou após a cura clínica espontânea, sob orientação médica. O critério de cura clínica para os pacientes tratados ou curados espontaneamente foi estabelecido considerando-se a completa cicatrização da lesão.

O histórico de doença progressa, apresentação de cicatriz característica da lesão (aspecto de pergaminho), IDRM positiva e ausência de quimioterapia foram os critérios para inclusão no grupo de cura espontânea. Como critérios de exclusão foram considerados a ausência de

cicatriz, negatividade para a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e tratamento quimioterápico prévio.

O grupo controle foi constituído por dez indivíduos saudáveis, residentes em área não endêmica, não-receptores de transfusão sanguínea e sem história prévia da doença. A coleta sanguínea foi realizada somente após os indivíduos de todos os grupos concordarem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndices 1, 2 e 3).

O tratamento quimioterápico foi realizado nos postos de saúde dos municípios deste estudo, utilizando-se o Glucantime[®] (antimoniato de N-metilglucamina) administrado por via intramuscular. O tratamento foi feito em ciclos de 20 a 30 dias em doses diárias de 20 mg/Kg com intervalo de 10 dias entre cada série. Os pacientes foram submetidos a nova série do tratamento de acordo com o processo de cicatrização de cada indivíduo.

O material coletado foi processado no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, na cidade de Recife-PE. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ (Anexo A e B).

5.3 Considerações éticas

Os procedimentos para coleta de sangue foram realizados somente após o paciente concordar em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (Apêndice A e B). O grupo controle (n=10) foi constituído por voluntários saudáveis, residentes em área não endêmica, somente após os mesmos concordarem em assinar o TCLE (Apêndice C). Foram coletados 40 ml de sangue dos grupos de pacientes e controles. Esse projeto faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ sob o número 60/05 e com Registro no CAEE 0757.0.095.000-05 (Anexo A e B)

5.4 Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes

Além da avaliação clínica e epidemiológica, os pacientes foram submetidos a alguns procedimentos laboratoriais para confirmação da doença em colaboração com o Serviço de

Referência em Leishmaniose do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ). Os exames incluíram:

a) Intradermorreação de Montenegro (IDRM)- realizada através da inoculação intradérmica de 0,1ml do antígeno leishmanina produzido e padronizado por Biomanguinhos/FIOCRUZ, na face anterior do antebraço. A leitura foi realizada 48 horas após a inoculação através do método da caneta esferográfica;

b) pesquisa direta através de escarificação da borda da lesão com lâmina de bisturi estéril, e posterior coloração por Giemsa da amostra obtida (examinada em microscopia ótica na objetiva 10x);

c) biópsia em borda da lesão ativa com *punch* (4-6mm de diâmetro), sendo parte destinada à extração do DNA parasitário e parte macerada e inoculada em meio de cultura específico para isolamento do parasito;

d) reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção do DNA parasitário, utilizando os primers específicos para o subgênero *Viannia* com o alvo de 750 pb;

e) reação de imunofluorescência indireta (IFI) para detectar a presença de anticorpos circulantes com o kit de Biomanguinhos, de acordo com as instruções do fornecedor.

5.5 Obtenção das frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis*

Formas promastigotas (cepa MHOM/BR/75/M2903) foram expandidas em cultura em meio Schneider's (SIGMA) até a fase de crescimento exponencial. A massa parasitária foi então submetida a três lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2) através de centrifugações a 800 X g, por 15 minutos, a 4°C. O sedimento resultante foi armazenado a –20°C até o momento do uso.

Para a obtenção dos antígenos solúvel e insolúvel, as alíquotas estocadas foram descongeladas, ressuspensas em água destilada contendo inibidores de proteases (metilfenil-fluoreto – PMSF, 0,01mM e ácido etilenodiaminotetracético – EDTA, 2mM) e pepstatina A, 0,001M. Em seguida, foram ultrassonicadas e centrifugadas a 10.000 X g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e submetido a uma nova centrifugação a 100.000 X g durante uma hora, à mesma temperatura. O sobrenadante resultante foi a fração antigênica solúvel enquanto que o sedimento foi a fração antigênica insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. Ambos foram submetidos a uma dosagem protéica segundo o

método de Bradford (1976) modificado por Read & Northcote (1981), além de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). Após esses procedimentos, as frações antigênicas foram armazenadas a -20°C até a utilização nos ensaios de cultura celular (BRITO *et al.*, 2000).

5.6 Perfil eletroforético dos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*

Os antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida e apresentaram proteínas cujos pesos moleculares variaram aproximadamente entre 66 e 16 kDa (Figura 7) quando comparadas ao peso molecular padrão (Sigma).

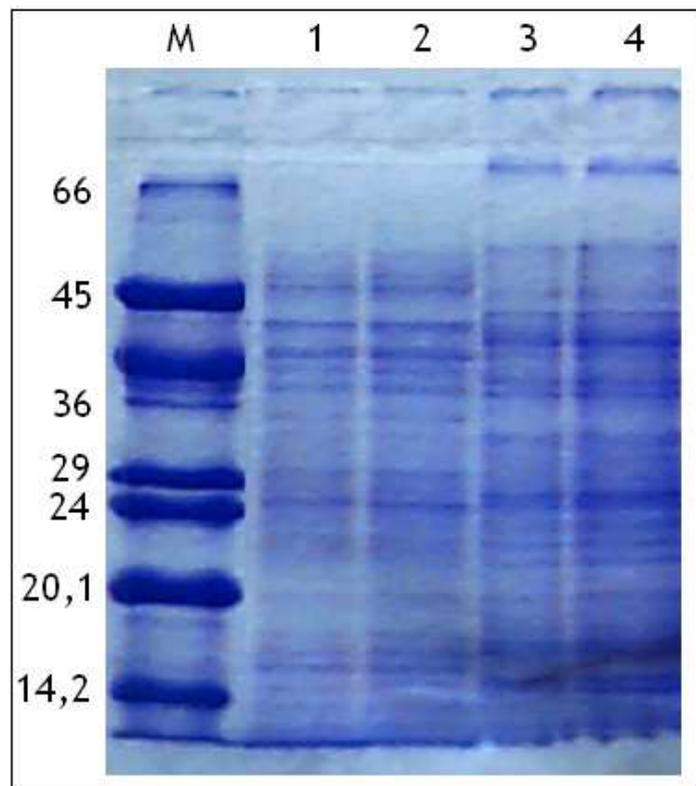


Figura 7: SDS-PAGE de proteínas solúveis (1 e 2) e insolúveis (3 e 4) de *L. (V.) braziliensis*.

Nos poços 1 e 3 foram depositados 10 μg de antígeno, enquanto que 15 μg de antígeno foram inseridos nos poços 2 e 4. M= marcadores de peso molecular em kDa (66 – albumina bovina; 45 – Ovalbumina; 36 – anidrase carbônica; 29 – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; 24 – tripsinogênio; 20,1 – inibidor de tripsina e 14,2 – α -lactoalbumina).

5.7 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico

Quarenta mililitros (40ml) de sangue foram coletados utilizando-se o sistema a vácuo. O sangue foi diluído em PBS pH 7,2 na proporção 2:1 e transferido para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque (GE Healthcare), também na proporção 2:1. Após centrifugação, a 400 X g por 30 minutos a 20°C, a camada de PBMC obtida entre a mistura de Ficoll-Hypaque e o plasma foi removida, depositada em novos tubos cônicos e lavada com 20 ml de PBS. Depois de nova centrifugação a 300 X g por 15 minutos a 20°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 10 ml de PBS (pH 7,2) e novamente centrifugado a 300 X g, durante o mesmo tempo e mesma temperatura. Depois do descarte do sobrenadante, o sedimento composto de PBMC foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB: Cultilab). Uma alíquota da suspensão celular foi então removida, diluída 1:20 em azul de trypan (Sigma) e quantificada em câmara de Neubauer.

5.8 Cultura para imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico e de citocinas intracitoplasmáticas

Para determinação das populações responsáveis pela produção de citocinas intracelulares, PBMC foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (SBF) por 48 horas (determinado após padronização), em estufa de CO₂ com 5% de umidade à 37°C, na presença das frações antigênica solúvel (1,25µg/ml) e insolúvel (2,5µg/ml) de *L. (V.) braziliensis*, obtidas de acordo com item 5.5, ou dos mitógenos PHA (fitohemaglutinina) (10µg/ml) ou de PMA (acetato de meristato forbol) (25 ng/ml)/ionomicina (1 µg/ml: todos da Sigma), estes últimos adicionados 4 horas antes do final da cultura. Brefeldina A (10 µg/ml) foi adicionada por 4 horas antes do término da cultura para assegurar a retenção da citocina no interior celular. Após a incubação, adicionou-se diretamente às culturas EDTA (ácido etilenodiaminotetraético) 20 mM, durante 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram então lavadas em solução salina contendo 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) e 0,1% de azida sódica (solução denominada de PBS-W), centrifugadas (370 x g, 7 minutos) e transferidas para tubos de

poliestireno e incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente, com anticorpos monoclonais de superfície marcados com isotiocinato de fluoresceína (FITC) (anti-CD4 e -CD8: BD-Bioscience). As células foram então fixadas com solução salina contendo 1% de paraformaldeído por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas por centrifugação (370 x g, 7 minutos) com PBS-W e permeabilizadas com PBS-W mais 0,5% de saponina (solução denominada de PBS-P). Logo em seguida, foram lavadas novamente com PBS-W e centrifugadas (400 x g, 5 minutos). As células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ , anti-TNF- α , anti-IL-10 (Miltenyi) e anti-IL-4 (BD-Bioscience) marcados com ficoeritrina (PE). Após incubação, as células foram lavadas com PBS-W e centrifugadas (400 x g, 5 minutos). Em seguida, adicionou-se solução fixadora (salina contendo 1% de paraformaldeído). As amostras foram analisadas (20 mil eventos/tubo) em citômetro de fluxo (FACSCalibur- Becton e Dickinson) através do software "Cell Quest Pro".

5.9 Ensaio de imunofenotipagem em sangue periférico

Para determinação da percentagem de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD25⁺, 5ml de sangue periférico dos pacientes e 5ml de sangue periférico dos indivíduos do grupo controle, foram coletados em tubos contendo EDTA. Alíquotas de 100ul desse sangue foram então transferidas para tubos de poliestireno contendo anticorpos anti-receptores CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ marcados com isotiocinato de fluoresceína (FITC), e CD25⁺ marcado com ficoeritrina (PE), sendo incubados por 30 minutos ao abrigo da luz. Terminada a incubação, 2 ml de solução de lise eritrocitária foi adicionados aos tubos, e foi feita uma nova incubação de 10 minutos. Seguida a lise, 1ml de PBS foi adicionado aos tubos e os mesmos foram levados à centrifugação por 7 minutos a 300xg, a temperatura ambiente. Após uma lavagem com PBS, a suspensão celular foi fixada com solução de paraformaldeído a 1% e se procedeu à leitura no citômetro de fluxo (FACSCalibur- Becton e Dickinson). As amostras foram então analisadas (50 mil eventos/tubo) em citômetro de fluxo (FACSCalibur- Becton e Dickinson) através do software "Cell Quest Pro".

5.10 Análise dos resultados obtidos na citometria de fluxo

As análises foram realizadas inicialmente delimitando-se a região linfocitária no gráfico de Dispersão Frontal (FSC) versus Dispersão lateral (SSC) (Figura 8 e Figura 9). A partir dessa região os gráficos de fluorescência (FL1 x FL2) foram construídos, delimitando-se os quadrantes de análise (Figura 10). Os limites dos quadrantes foram sempre baseados na população negativa. Os valores considerados para análise da fluorescência foram os do percentual da região linfocitária para cada quadrante.

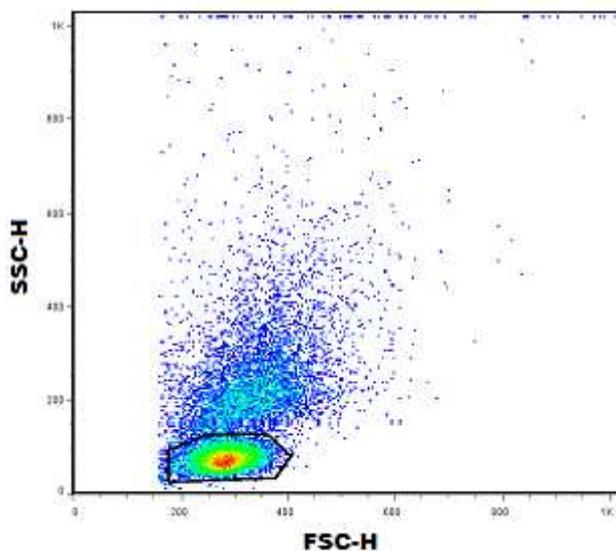


Figura 8: Exemplo de gráfico de FSCxSSC em PBMC com delimitação na região linfocitária.

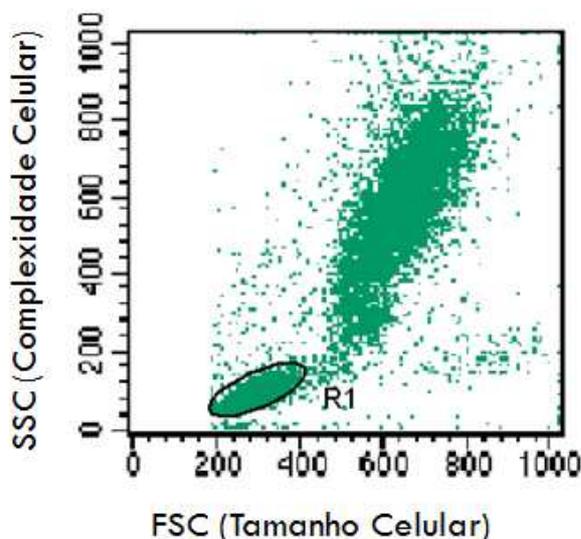


Figura 9: Exemplo de gráfico FSC x SSC em sangue periférico com delimitação na região linfocitária

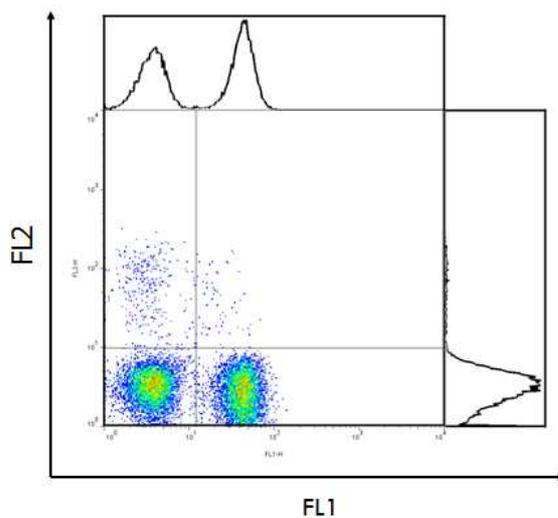


Figura 10: Exemplo de gráfico de fluorescência (FL1xFL2) utilizado para avaliar o percentual de células T produtoras de citocinas na citometria de fluxo.

5.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do Laboratório de Métodos Quantitativos do Núcleo de Saúde Coletiva do CPqAM e através dos softwares SPSS 8.0 e GraphPad Prisma 5.1, empregando-se testes não paramétricos. Para as análises intra grupos foi utilizado o teste U de Mann-Whitney e para as análises entre os grupos o teste de Kruskal-Wallis. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Pacientes e diagnóstico

Foram selecionados 17 indivíduos com LTA antes do tratamento (AT), com uma evolução da lesão média de 1,6 meses; 11 destes que aceitaram retornar seis meses após o tratamento (PT); e 5 pacientes curados espontaneamente (CE). A idade dos pacientes AT variou de 13-85 anos, com uma média de $31,47 \pm 17,3$ anos enquanto que do grupo PT variou de 18-44 (média de $32,45 \pm 10,65$ anos); Já os pacientes que se curaram espontaneamente apresentaram idades entre 24-73 anos com uma média de idade $52,8 \pm 19,21$. O grupo controle (CT) foi representado por 10 indivíduos saudáveis de área não endêmica, sem histórico da doença, com idade entre 22-51, e média de $30,6 \pm 10,97$ anos (Tabela 1)

Antes do tratamento todos os pacientes apresentaram de 1 a 2 lesões ulceradas (média de $7,75 \text{cm}^2 \pm 6,59$) distribuídas, em sua maioria, em áreas descobertas do corpo. Os pacientes foram tratados com Glucantime[®], exceto os pacientes que se curaram espontaneamente. Após o tratamento, todos os pacientes apresentaram completa cicatrização das lesões com cicatriz característica em formato de pergaminho. Os pacientes CE foram captados de 6 meses até 5 anos após a cicatrização de suas lesões (Tabela 1 e 2).

Tabela 1: Principais características do grupo de estudo

<i>Características</i>	<i>Grupo de Estudo</i>			
	<i>AT</i>	<i>PT</i>	<i>CE</i>	<i>CT</i>
Número	17	11	05	10
Idade	13-85	18-44	22-73	22-51
Razão H/M*	8/9	6/5	1/4	4/6
Duração média da doença/cicatriz	1,6 meses	6 meses	7 meses	-
No. médio de lesões	1,36 (1-4)	1,27 (1-2)	1,6 (1-4)	-

*Razão H/M= Razão homem/mulher; AT= Antes do tratamento; PT= Pós-tratamento; CE= Curados espontaneamente, CT= Controles

De acordo com os parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, todos os pacientes participantes deste estudo foram diagnosticados como portadores da LTA em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmaniose do CPqAM/Fiocruz-PE (Tabela 2). Os exames laboratoriais realizados por esse serviço incluíram IDR, IFI, PCR e Pesquisa Direta, tendo os pacientes apresentado resultados positivos em pelo menos um dos exames, confirmando o diagnóstico da LTA. A IDR foi realizada em 19 dos 21 pacientes desse estudo, que apresentaram endurações iguais ou maiores que 8mm após 48 horas, resultado considerado positivo (90,5% de positividade). Já a IFI foi positiva em 70% dos casos (14 dos 20 pacientes testados). Em relação à pesquisa direta, 5 dos 19 pacientes analisados apresentaram resultados positivos. Por fim, a PCR foi realizada em amostras de 10 pacientes, apresentando todos os resultados positivos.

Tabela 2: Exames laboratoriais, tratamento e ensaios realizados com o grupo de estudo*Grupo de Estudo*

<i>Paciente</i>	IDRM ¹	Pesq Direta ²	IFI ³	PCR ⁴	No. Ampolas ⁵	Status do paciente
1	10mm	+	+	N/R	1	CE (5 anos)
2	10mm	N/R	-	N/R	0	CE (8 meses)
3	10mm	N/R	-	N/R	0	CE (1 ano)
4	8mm	-	+	+	40	AT,PT
5	10mm	+	+	N/R	100	AT,PT
6	10mm	-	+	N/R	40	AT,PT
7	N/R	-	+	N/R	40	AT
8	8mm	-	N/R	N/R	60	AT,PT
9	8mm	-	+	N/R	20	AT,PT
10	N/R	-	+	+	24	AT,PT
11	10mm	-	+	+	40	AT,PT
12	10mm	-	+	+	100	AT
13	11mm	-	+	N/R	N/I	AT
14	9mm	-	+	N/R	0	CE (1ano e 3 meses)
15	14mm	-	+	+	40	AT
16	10mm	-	-	N/R	0	AT,CE (6 meses)
17	12mm	-	+	+	80	AT
18	16mm	-	-	+	40	AT,PT
19	14mm	+	-	+	40	AT,PT
20	9mm	+	-	+	40	AT,PT
21	14mm	+	+	+	40	AT, PT

¹IDRM: Intradermorreação de Montenegro; ²Pesquisa Direta; ³IFI: Imunofluorescência Indireta; ⁴PCR: Reação em cadeia de polimerase; ⁵No. Ampolas: Número de Ampolas de Glucantime® utilizadas; +: Positivo; -: Negativo; NI: Não informado; N/R: Não realizado; (): Tempo de apresentação da cura clínica espontânea.

6.2 Percentual de linfócitos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD25⁺ no sangue periférico de pacientes com LTA ativa em ensaios *ex vivo*.

Analisamos o percentual de linfócitos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD25⁺ no sangue periférico dos pacientes e controles, visando demonstrar o perfil das células imunológicas antes da estimulação antigênica, ou seja, *ex vivo*.

Os resultados indicaram um perfil semelhante e sem diferença significativa entre pacientes antes do tratamento (AT), pacientes após o tratamento (PT), pacientes curados espontaneamente (CE) e controles (CT) em relação ao percentual de linfócitos T CD3⁺ e CD4⁺. Embora sem diferença significativa, os linfócitos T CD8⁺ se mostraram levemente aumentados em pacientes PT e CE em relação aos CT e AT (Tabela 3 e Figura 11).

Tabela 3: Percentual de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD25⁺ em linfócitos do sangue periférico de pacientes e controles.

% de linfócitos	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD25 ⁺
AT	62,77 (±5,58)	39,93 (±4,38)	16,65 (±5,35)	6,93 (±3,68)
PT	64,13 (±4,98)	42,24 (±4,4)	18,38 (±5,83)	14,06 (±3,39)
CE	63,45 (±6,88)	38,93 (±4,14)	22,92 (±7,55)	9,16 (±4,51)
CT	65,36 (±6,38)	38,53 (±4,94)	15,5 (±4,29)	3,47 (±1,5)

Em relação aos linfócitos CD25⁺, ao se comparar os grupos de pacientes e controles, observou-se significativo aumento de duas vezes entre ATxCT (p=0,0003), de aproximadamente três vezes (2,6) entre CExCT (p=0,0017) e de quatro vezes entre PTxCT (p<0,0001). Aumento significativo (2x) no percentual de linfócitos T CD25⁺ também foi visto entre os grupos PTxAT (p=0,0004) (Figura 11).

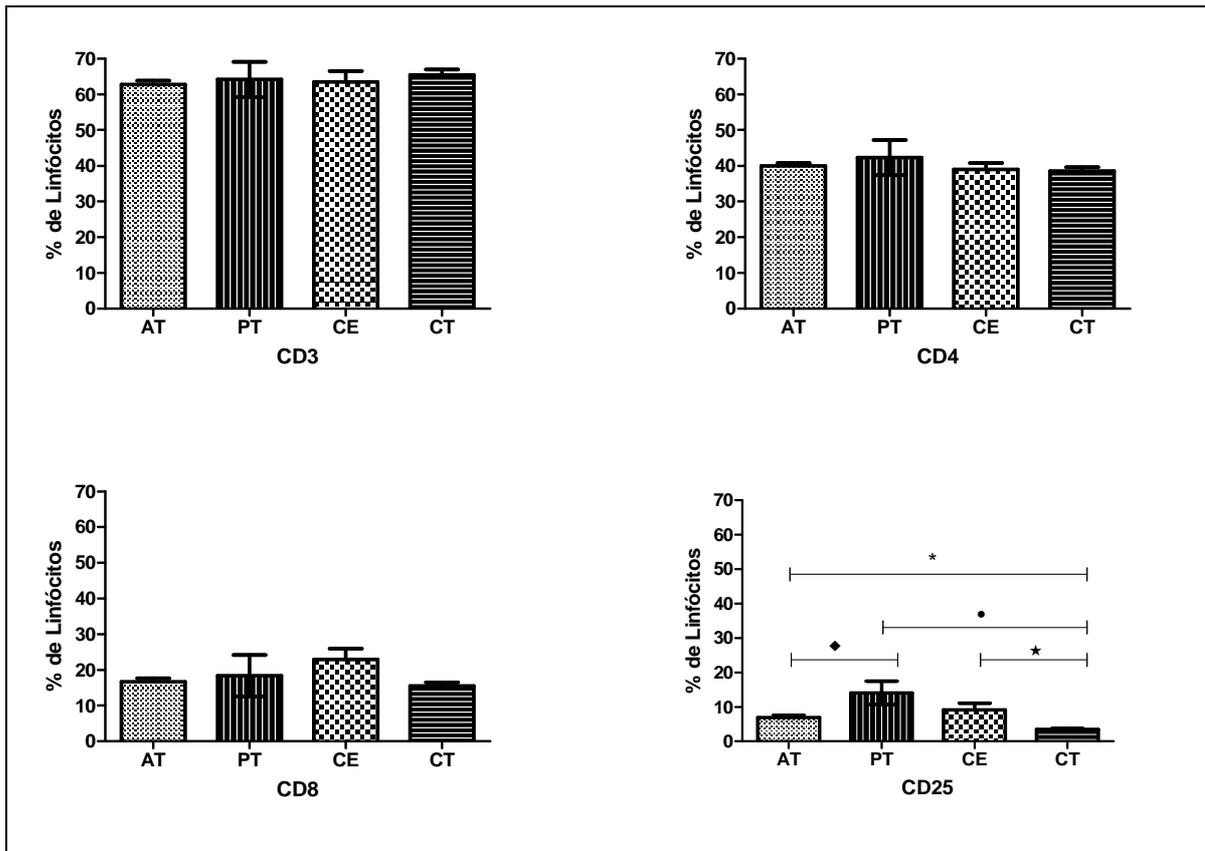


Figura 11: Percentual de linfócitos no sangue periférico de pacientes com LTA e controles.

Os resultados estão expressos como média dos valores \pm SEM; diferenças significativas considerando $p < 0,05$; * = diferença significativa entre pacientes antes do tratamento (AT) x grupo controle (CT); ♦ = diferença significativa entre pacientes antes do tratamento (AT) x pós-tratamento (PT); ★ = diferença significativa entre pacientes curados espontaneamente (CE) x grupo controle (CT); • = diferença significativa entre pacientes pós-tratamento (PT) x grupo controle (CT); ◐ = diferença significativa entre pacientes pós-tratamento (PT) x grupo controle (CT)

6.3 Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em culturas de PBMC após estímulo *in vitro* com antígenos e mitógenos.

Na análise fenotípica das células T CD4⁺ após cultura de 48h com antígenos e mitógenos, observou-se que as células dos pacientes AT e PT apresentavam um percentual superior e significativo ao comparar com o grupo CT (AT: PHA $p=0,035$; IONO $p=0,022$; SOL $p=0,018$; INS $p=0,040$) (PT: PHA $p=0,018$; SOL $p=0,037$; INS $p=0,022$). O percentual de células T CD4⁺ dos pacientes CE foi levemente superior ao do grupo CT, no entanto sem diferença estatística (Figura 12).

O percentual de linfócitos T CD8⁺, por outro lado, foi inferior aos CT em pacientes AT, aumentando significativamente PT (PHA $p=0,029$; IONO $p=0,015$; SOL $p=0,033$; INS

p=0,025). O percentual de células T CD8⁺ em pacientes CE também foi superior estatisticamente quando comparado com os pacientes AT (PHA p=0,012; IONO p=0,019; SOL p= 0,023; INS p=0,021). Os pacientes CE apresentaram percentuais superiores de células T CD8⁺ quando comparados aos demais grupos. Quando a fração antigênica insolúvel (INS) e a fitohemaglutinina (PHA) foram utilizadas nas culturas, o percentual de células T CD8⁺ de PT (PHA p= 0,023; INS p=0,028) e CE também foi significativamente diferente quando comparado aos CT (Figura 12).

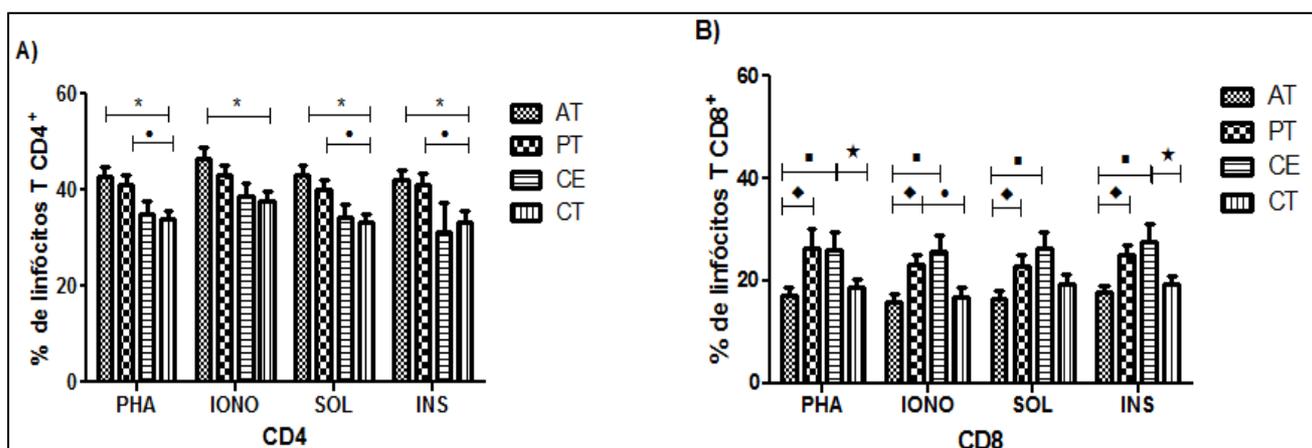


Figura 12: Gráfico comparativo do percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com LTA e controles após estimulação com as frações antigênicas solúvel (SOL) e insolúvel (INS) de *L. (V.) braziliensis* e dos mitógenos fitohemaglutinina (PHA) e acetato de meristato forbol/ ionomicina (IONO).

Os resultados estão expressos como média dos valores ± SEM; diferenças significativas considerando p <0,05; * = diferença significativa entre pacientes antes do tratamento (AT) x grupo controle (CT); ♦ = diferença significativa entre pacientes pós-tratamento (PT) x antes do tratamento (AT); ★ = diferença significativa entre pacientes curados espontaneamente (CE) x grupo controle (CT); • = diferença significativa entre pacientes pós-tratamento (PT) x grupo controle (CT); ■ = diferença significativa entre pacientes curados espontaneamente (CE) x pacientes antes do tratamento (AT); • = diferença significativa entre pacientes pós-tratamento (PT) x grupo controle (CT)

6.4 Comparação do percentual de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em ensaios de *ex vivo* x cultura.

Visando demonstrar o perfil das células T CD4⁺ e T CD8⁺ durante a resposta imunológica, foi realizada uma comparação entre o percentual desses linfócitos no sangue periférico dos pacientes e controles no contexto *ex vivo* assim como após cultura de PBMC com as frações antigênicas solúvel (SOL) e insolúvel (INS) de *L. (V.) braziliensis* (Figura 13).

Os pacientes não apresentaram diferença significativa ao comparar o percentual de linfócitos T CD4⁺ nos ensaios *ex-vivo* e nas culturas com os antígenos. Em relação aos

linfócitos T CD8⁺ é interessante notar que pacientes CE e PT, apresentam níveis mais elevados dessas células após estimulação com os antígenos SOL e INS. Essa diferença foi estatisticamente significativa ao se comparar o percentual de células T CD8⁺ na situação *ex vivo* com as células T CD8⁺ após estimulação com a fração antigênica solúvel e insolúvel em pacientes PT (SOL p= 0,006; INS p=0,001; entre grupos p= 0,009) (Figura 13).

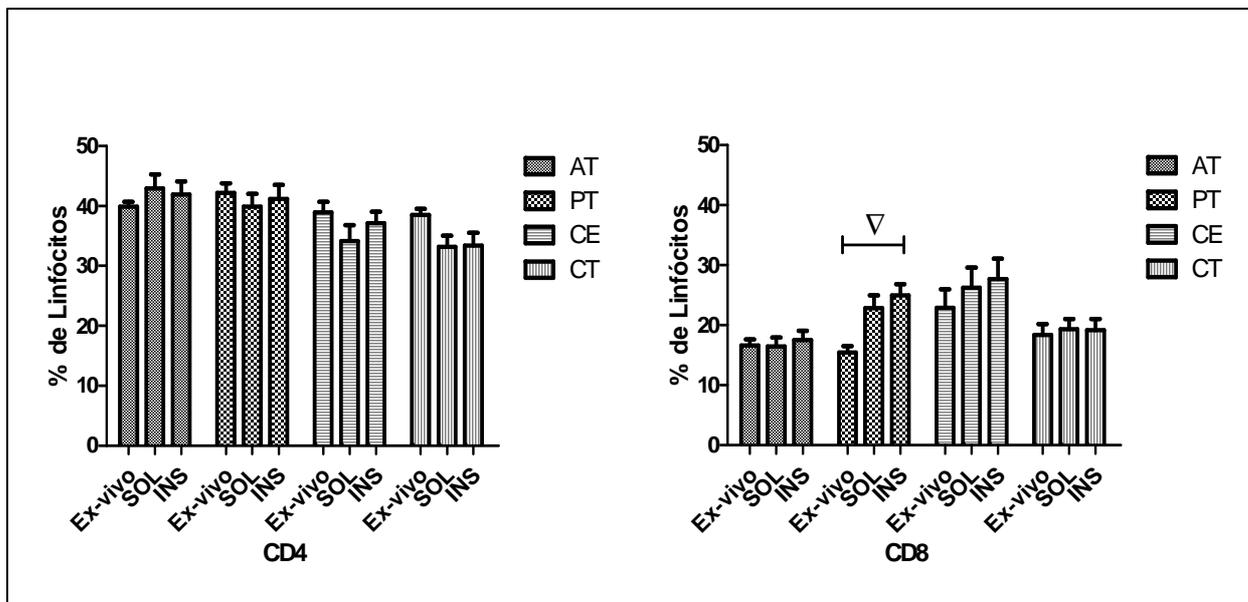


Figura 13: Comparação do percentual de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em ensaios de ex-vivo e cultura de pacientes com LTA e controles

Os resultados estão expressos como média dos valores ± SEM; diferenças significativas considerando p <0,05; ∇ = diferença significativa ao se comparar os valores dos grupos PT *ex vivo* x fração antigênica solúvel e/ou insolúvel.

Comparando-se a razão CD4⁺/CD8⁺ em ensaios *ex-vivo* e culturas de PBMC, percebe-se uma variação nos valores apresentados pelos grupos estudados. Os pacientes AT, PT e os CT nos ensaios *ex vivo*, assim como os pacientes AT nas culturas, apresentaram um razão CD4⁺/CD8⁺ >2, enquanto que pacientes CE nos ensaios *ex vivo* e os PT e CE após estimulação antigênica apresentaram uma razão < 2 (Tabela 4).

Tabela 4: Razão CD4⁺/CD8⁺ em ensaios *ex vivo* e de cultura de PBMC

Razão CD4 ⁺ /CD8 ⁺	<i>Ex vivo</i>	Ag Solúvel	Ag Insolúvel
AT	2,39	2,6	2,38
PT	2,29	1,4	1,65
CE	1,69	1,3	1,12
CT	2,48	1,71	1,74

6.5 Avaliação dos tempos de cultura para produção das citocinas intracitoplasmáticas (IL-10, IL-4, TNF- α e IFN- γ).

A avaliação do melhor tempo de cultura para produção das citocinas IL-10, IL-4, TNF- α e IFN- γ foi feita nos tempos de 4, 12 e 48 horas (Figura 14). Os testes foram feitos com 4 pacientes para os tempos de 4 e 48 horas e 1 paciente para o tempo de 12 horas.

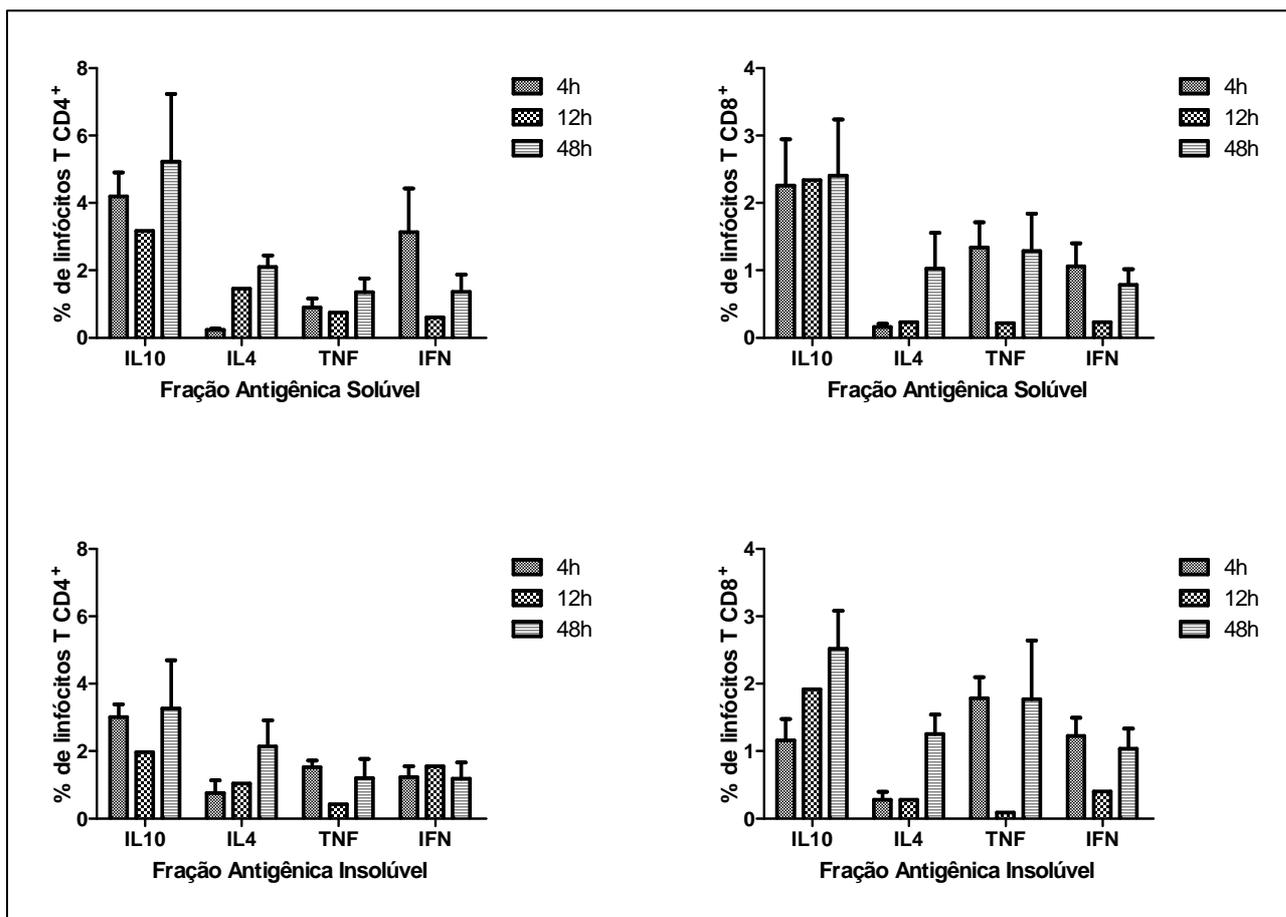


Figura 14: Gráfico comparativo da produção de citocinas em 4h, 12h e 48h de cultura por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ após estimulação com as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. Os resultados estão expressos como média dos valores \pm SEM.

Não foi observada diferença estatística na comparação intragrupos, no entanto observamos que os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produziram uma maior quantidade de IL-10 e IL-4 no tempo de 48h. Já a produção das citocinas TNF- α e IFN- γ apresentou valores próximos nos tempos de 4 e 48 horas, com um leve predomínio no tempo de 4h. Sendo assim, através da análise dos resultados, o tempo de 48 horas foi escolhido para a realização dos

ensaios posteriores, uma vez que representava de maneira mais ampla o potencial de produção de citocinas pelos linfócitos.

6.6 Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de citocinas em culturas de PBMC após estímulo *in vitro* com mitógeno.

Após estimulação com os mitógenos PHA ou PMA/Ionomicina diferentes perfis foram observados. A PHA induziu uma maior produção de IL-10 e IL-4 por células T CD4⁺ e CD8⁺ quando comparados a estimulação por PMA/Ionomicina. A produção de IFN- γ por células T CD4⁺ também foi maior quando estimuladas por PHA. Já a PMA/Ionomicina induziu maior produção TNF- α por células T CD4⁺ e CD8⁺ e a produção de IFN- γ por T CD8⁺ quando comparado a PHA (Figura 15).

Ao considerar o potencial individual dos mitógenos foi observado que a PHA estimulou nas células T CD4⁺ de todos os grupos AT avaliados uma maior produção das citocinas IL-10 e IL-4. Em relação a IL-10 diferenças significativas foram verificadas entre ATxCT (p=0,0005), ATxPT (p=0,029) e CExCT (p=0,002). Células T CD4⁺ também apresentaram maior percentual de TNF- α nos grupos PT, CE e CT, com diferenças significativas PTxAT (p=0,0028), CExAT (p=0,0007), CExCT (p=0,029) e PTxCT (p=0,043). Diferença significativa na produção de IFN- γ entre CExAT (p=0,018) foi também observado nessas células. Já as células T CD8⁺ apresentaram uma maior produção de IFN- γ nos grupos PT, CE e CT, sendo significativo em PTxAT (p=0,024) e CExAT (p=0,003). Células T CD8⁺ apresentaram valores de IFN- γ próximos as células T CD4⁺ no grupo AT. As células T CD8⁺ também foram as responsáveis pela maior produção de TNF- α nos pacientes AT, com diferenças significativas entre CExAT (p=0,0137) e CExCT (p=0,045). Essas células apresentaram valores significativos entre ATxCE (p=0,0084) na produção de IL-10. Sendo assim os resultados indicam predomínio de um perfil Th2 em pacientes AT, com produção principalmente de IL-10 e IL-4 por células T CD4⁺, e uma prevalência de citocinas IFN- γ e TNF- α produzidas por linfócitos T CD8⁺ em pacientes PT. Já os pacientes CE apresentam um predomínio na produção de TNF- α por células T CD4⁺ e de IFN- γ por células T CD8⁺, indicando uma prevalência da resposta do tipo 1 (Figura 15).

Após estimulação das culturas com os mitógenos PMA/Ionomicina, observou-se produção significativa de IL-10 entre ATxCT (p=0,0029) e ATxCE (p=0,043) e de IL-4 entre

ATxCT ($p=0,0136$), ATxCE ($p=0,0447$) e ATxPT ($p=0,0489$) pelas células T CD4⁺. Essas células também produziram percentual significativo de TNF- α entre PTxAT ($p=0,0002$) e CExAT ($p=0,0431$). Os linfócitos T CD8⁺ produziram mais IFN- γ em todos os grupos estudados e TNF- α nos pacientes AT. Diferenças significativas também foram observadas na produção de IL-10 entre ATxCE ($p=0,0108$) e ATxCT ($p=0,001$), e de IL-4 entre ATxCT ($p=0,0454$) e ATxCE ($p=0,0233$) pelas células T CD8⁺. Isso sugere um perfil Th2 em pacientes AT com diferenças significativas observadas na produção de IL-10 e IL-4. Já em pacientes PT, direciona-se a resposta para um perfil do tipo 1, com produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ principalmente por linfócitos T CD8⁺. O grupo dos CE apresenta um perfil Th1, com uma maior produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α por linfócitos T CD4⁺ e de IFN- γ por T CD8⁺, e baixa produção das citocinas inibitórias IL-10 e IL-4 por T CD4⁺ (Figura 15).

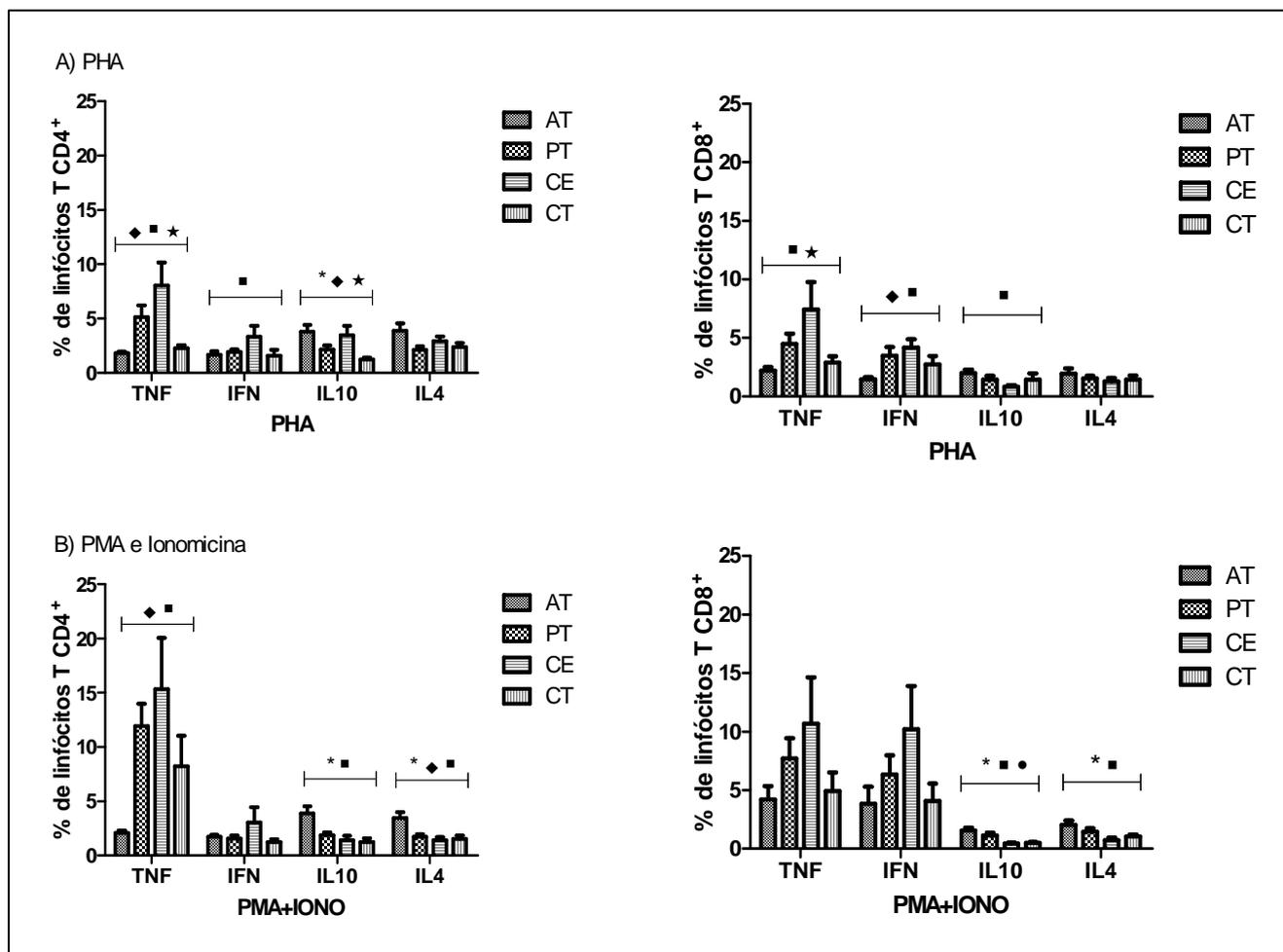


Figura 15: Percentual de expressão de citocinas em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes com LTA e controles após estimulação com os mitógenos (A) PHA (10µg/ml) e (B) PMA (25 ng/ml) / Iono (1 µg/ml).

Os resultados estão expressos como média dos valores ± SEM; diferenças significativas considerando p < 0,05; * = diferença significativa entre pacientes antes do tratamento(AT) x grupo controle (CT); ♦ = diferença significativa entre pacientes pós-tratamento (PT) x antes do tratamento(AT); ■ = diferença significativa entre pacientes antes do tratamento(AT) x pacientes curados espontaneamente (CE); ★ = diferença significativa entre pacientes curados espontaneamente (CE) x grupo controle (CT); • = diferença significativa entre pacientes pós-tratamento (PT) x grupo controle (CT)

6.7 Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de citocinas em culturas de PBMC após estimulação com as frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis*.

A fonte celular e a frequência das células produtoras de citocinas, induzidas pelas frações antigênicas de *Leishmania (V.) braziliensis*, foram determinadas após cultura de 48h. Quando as frações antigênicas solúvel e insolúvel foram usadas, diferentes perfis foram observados. Células T CD8⁺ foram as principais responsáveis pela produção de citocinas do perfil 1, como TNF-α e IFN-γ após estimulação com os antígenos. Já as células T CD4⁺ foram as principais fontes da produção de TNF-α em pacientes PT e CE e também as principais responsáveis pela produção das citocinas inibitórias IL-10 e IL-4 nessas cultura (Figura 16).

Analisando a fração antigênica solúvel percebe-se que no grupo AT os linfócitos T CD4⁺ apresentaram produção significativa das citocinas IL-10 ($p < 0,0001$) e IL-4 ($p = 0,0302$) ao se comparar com o grupo CT. Já os linfócitos T CD8⁺ do grupo AT produziram principalmente TNF- α , IL4 e quantidades significativas de IL-10 ($p = 0,0169$), também comparado aos controles. Após o tratamento observa-se uma mudança nesse quadro, com diminuição na produção de IL-4 e diminuição significativa da produção de IL-10 ($p = 0,0032$) entre os grupos ATxPT por linfócitos T CD4⁺, no entanto os pacientes PT ainda apresentavam produção significativa de IL-10 em relação aos CT ($p = 0,005$). Além disso, observou-se um aumento significativo da produção de IFN- γ entre ATxPT ($p = 0,0239$) e de TNF- α entre PTxAT ($p = 0,0002$) e PTxCT ($p = 0,0052$) por linfócitos T CD4⁺. Em relação aos linfócitos T CD8⁺ a mesma evolução foi observada. Diminuição de IL-4 e diminuição significativa de IL-10 entre ATxPT ($p = 0,0084$), e um aumento significativo de TNF- α ($p = 0,0143$) e IFN- γ ($p = 0,0205$) entre PTxAT. Após estimulação com Ag Sol, os pacientes CE apresentaram uma maior produção de TNF- α , IFN- γ e IL-4 pelas células T CD4⁺ e de TNF- α e IFN- γ (estatisticamente significativa em ATxCE, $p = 0,046$) por células T CD8⁺. Em relação à produção de IL-10 pelo grupo CE, diferença significativa foi vista na produção das células T CD4⁺ nos grupos ATxCE ($p = 0,037$) e CExCT ($p = 0,019$) (Figura 16).

Após estimulação com a fração antigênica insolúvel percebe-se que no grupo AT as células T CD4⁺ produziram quantidade significativa de IL-10 ($p = 0,0054$) e IL-4 ($p = 0,0287$) em relação ao grupo controle. Já as células T CD8⁺ produziram quantidade relevante de IL-10 entre os grupos ATxCT ($p = 0,0042$). Após o tratamento, um aumento na produção de IFN- γ e TNF- α é observado, sendo esta última significativa nos linfócitos T CD4⁺ ($p = 0,003$) e CD8⁺ ($p = 0,0065$) dos grupos PTxAT. Nos linfócitos T CD8⁺ a produção de IL-10 e IL-4 antes e após tratamento foi similar. Diferença significativa foi observada no percentual de IL-10 entre PTxCT ($p = 0,0201$) nas células T CD4⁺. Os pacientes CE após estimulação com o antígeno insolúvel apresentaram uma maior produção de TNF- α , sendo esta significativa ao comparar o percentual produzido pelas células T CD4⁺ do grupo CE aos CT ($p = 0,002$), e significativa menor produção de IL-10 ao comparar a produção dos T CD4⁺ ($p = 0,008$) e T CD8⁺ ($p = 0,0019$) de ATxCE e dos T CD8⁺ dos grupos PTxCE ($p = 0,043$) (Figura 16)..

No geral foi observada uma resposta imune similar entre os pacientes CE e PT. Ocorreu com um predomínio das citocinas do perfil 1 comparada aos pacientes AT, especialmente após estimulação com o antígeno solúvel.

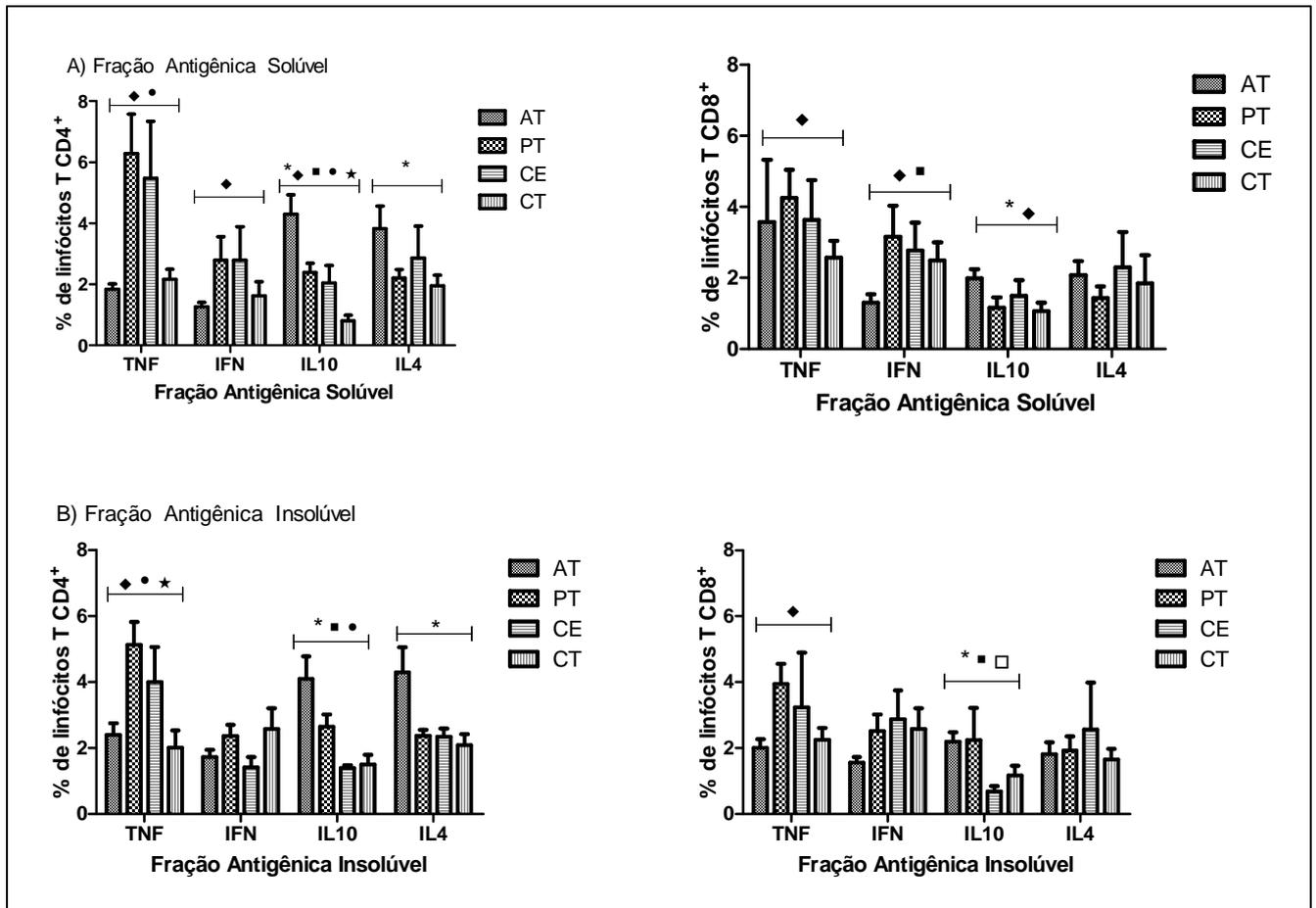


Figura 16: Percentual de expressão de citocinas em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes com LTA e controles após estimulação com as frações antigênicas (A) solúvel (1,25µg/ml) e (B) insolúvel (2.25µg/ml) de *L. (V) braziliensis*.

Os resultados estão expressos como média dos valores ± SEM; diferenças significativas considerando p <0,05; * = diferença significativa entre pacientes antes do tratamento (AT) x grupo controle (CT); ◆ = diferença significativa entre pacientes pós-tratamento (PT) x antes do tratamento(AT); ■ = diferença significativa entre pacientes antes do tratamento(AT) x pacientes curados espontaneamente (CE); ★ = diferença significativa entre pacientes curados espontaneamente (CE) x grupo controle (CT); ● = diferença significativa entre pacientes pós-tratamento (PT) x grupo controle (CT)/ □ = diferença significativa entre pós-tratamento (PT) x curados espontaneamente (CE).

Quando se compara a razão IFN-γ/IL-10, sugerido como um parâmetro útil para prever a evolução clínica dos pacientes ou sua resposta a terapia, observa-se que os pacientes PT, CE e o grupo controle apresentavam uma razão próxima ou maior que 1, enquanto os pacientes AT apresentavam uma razão menor que 1 (Tabela 5).

Tabela 5: Razão IFN- γ /IL-10 em culturas de PBMC de pacientes e controles após estimulação com as frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis*.

Razão IFN- γ /IL-10	Ag Solúvel		Ag Insolúvel	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
AT	0,32	0,86	0,4	0,62
PT	1,16	1,86	0,91	1,12
CE	1,36	1,84	1,02	4,22
CT	2,02	2,33	1,03	2,21

7. DISCUSSÃO

A LTA é uma doença que apresenta diferentes aspectos clínicos. Na busca dos mecanismos responsáveis pela diferença entre susceptibilidade e resistência a leishmaniose, estudos foram desenvolvidos, principalmente com modelos animais (PISCOPO; MALLIA, 2006; REIS *et al.*, 2006; ROBERTS, 2006). No entanto, ainda não existe uma relação bem estabelecida desses mecanismos. Sendo assim, a investigação da resposta imune e a associação dos perfis imunológicos encontrados com a evolução clínica da doença são essenciais na busca de novas estratégias para testes prognósticos, intervenções imunológicas e vacinas.

No presente estudo caracterizamos imunofenotipicamente pacientes AT, PT e CE em ensaios *ex vivo* e de cultura frente à estimulação *in vitro* com as frações antigênica solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*, assim como dos mitógenos PHA e PMA/Ionomicina. Já é bem aceita a idéia de que controle da infecção por *Leishmania* é dependente de resposta celular Th1, e sua susceptibilidade relacionada ao padrão Th2. Por isso, o presente trabalho também avaliou o percentual de citocinas produzidas nas culturas de PBMC dos pacientes e controles.

Todos os pacientes foram provenientes de áreas endêmicas na região da Zona da Mata de Pernambuco. Dezesete pacientes foram diagnosticados como portadores de LTA ativa, manifestando-se na forma de lesões cutâneas típicas: ulceradas e com bordas elevadas, em moldura, geralmente em partes descobertas do corpo. Desses pacientes, 11 retornaram 6 meses após o tratamento quimioterápico com Glucantime[®] e completa cicatrização das lesões. Cinco pacientes que apresentaram cura sem intervenção quimioterápica, considerados curados espontaneamente, também foram avaliados. Vale ressaltar que esse grupo é um excelente modelo para compreender os mecanismos da resposta imune eficazes nas infecções por *Leishmania*.

Uma vez que a LTA apresenta similaridades em relação às manifestações clínicas com outras enfermidades, o diagnóstico preciso é fundamental (GONTIJO; CARVALHO, 2003; REINTHINGER *et al.*, 2007). Como não há um teste laboratorial considerado padrão-ouro, a doença é diagnóstica baseada em padrões clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (GONTIJO; CARVALHO, 2003; REIS *et al.*, 2006). Os pacientes deste estudo tiveram seu diagnóstico confirmado por critérios clínicos, epidemiológicos e por ao menos um exame laboratorial. Os exames laboratoriais foram realizados em colaboração com o Serviço de

Referência em Leishmaniose do CPqAM/Fiocruz-PE e incluíram: IDRM, Pesquisa Direta, IFI e PCR. Por motivos operacionais, alguns dos pacientes não puderam ser diagnosticados por todos os métodos citados.

A IDRM apresentou 90,5% de positividade nos pacientes do estudo. Vários autores reportaram uma sensibilidade acima de 90% nos casos de LTA, sendo este um teste útil para presumir a infecção, já que reflete a resposta de hipersensibilidade celular tardia e que geralmente persiste positiva após o tratamento, ou cicatrização da lesão cutânea tratada ou curada espontaneamente (BRASIL, 2007; VEGA-LOPEZ, 2003)

A IFI foi positiva em 70% dos casos. Essa ferramenta nas lesões ulceradas por *L. (V.) braziliensis* apresenta uma sensibilidade em torno de 70% no primeiro ano da doença e, após o tratamento ou cura, os títulos podem cair ou desaparecer em alguns meses. A positividade deste exame está associada ao tempo de evolução da doença, e resultados negativos podem ser observados quer pela reduzida antigenicidade do parasito ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes. É uma técnica passível de reação cruzada com espécies pertencentes à família Trypanosomatidae (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Os ensaios de PCR realizados apresentaram resultados positivos. Estudos realizados por Bensoussan *et al.* (2006) demonstraram que ensaios utilizando PCR se mostraram muito mais sensíveis que métodos parasitológicos clássicos de diagnóstico, com positividade variando de 53 a 98,7%. Essa técnica oferece 100% de sensibilidade e acima de 90% especificidade, sendo capaz de detectar baixas quantidades de parasitos na infecção (AMEEN, 2010).

Em relação à pesquisa direta, 26% pacientes analisados apresentaram resultados positivos. Esse valor é condizente com os estudos realizados por diferentes grupos de pesquisa, que sugerem que a pesquisa direta tem baixa sensibilidade, com percentuais que variam de 15-30% de positividade (GOTO; LINDOSO, 2010). Vale ressaltar que no referido teste quanto maior o tempo de duração da lesão, menor a probabilidade de se encontrar parasitos (AMEEN, 2010).

Uma vez confirmado o diagnóstico, o tratamento é iniciado, sendo este baseado primariamente na administração de sais de antimoniais por via intramuscular (BRASIL, 2007; REINTHINGER *et al.*, 2007). Esses sais, no entanto, são caros, apresentam elevada toxicidade e requerem muitas injeções com administração supervisionada. Todos esses fatos justificam a procura de protocolos para tratamentos alternativos, que poderiam reduzir a quantidade de antimonial administrada aos pacientes, sua via de administração, os efeitos tóxicos do tratamento e a resistência que vem sendo reportada em alguns estudos (GOTO; LINDOSO, 2010; REINTHINGER *et al.*, 2007). Para a eficácia dos antimoniais pentavalentes

no tratamento da leishmaniose, uma eficiente resposta mediada por célula é requerida, estando esta resposta imunossuprimida quando há infecção (CROFT *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008). Dessa maneira, a relação entre imunocompetência e quimioterapia nas infecções causada por *Leishmania spp.* e o seu estudo são de grande importância clínica para o hospedeiro.

A resolução das infecções humanas na leishmaniose é dependente primariamente nos eventos das células T, seus subtipos e perfil de citocinas produzidas (COUTINHO *et al.*, 1998; DA-CRUZ *et al.*, 2005). Assim, as células T CD4⁺ e CD8⁺ possuem uma variedade de funções que se sobrepõem, sendo moduladas por sinais do seu meio, assim como pela história de estimulação das células (SUNI *et al.*, 2005). Portanto, a imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico é uma importante ferramenta para caracterizar a resposta imunológica individual, já que ela reflete o status imunológico atual do indivíduo.

Em nossos ensaios, similaridades fenotípicas ocorreram na análise das células T CD3⁺ e T CD4⁺ nos ensaios de *ex vivo* de pacientes AT, PT, CE e do grupo CT, estando os valores de acordo com as médias obtidas por Autissier *et al.*, (2010) e Faria *et al.* (2008). Botelho *et al.* (2009) estudando a influência dos tratamentos quimioterápicos no perfil fenotípico de pacientes, também não perceberam diferenças no percentual de linfócitos T CD3⁺ e CD4⁺ entre os grupos de pacientes e entre esses e os controles, sugerindo que não foram induzidas mudanças deletérias nos pacientes.

Ao avaliar os linfócitos T CD8⁺ *ex vivo*, observamos leve aumento sem significância nos pacientes PT e CE em relação aos AT e CT. Isso pode indicar a participação dessas células no controle das infecções por LTA, já que muitos estudos indicam sua participação na resolução da doença (COUTINHO *et al.* 1998; DA CRUZ *et al.*, 1994; GAARFAR, 1999; RUIZ; BECKER, 2007).

Em relação ao percentual dos linfócitos T CD25⁺, fenótipo relacionado com as células Treg, foi visto um aumento de duas vezes entre pacientes AT e PT, assim como entre pacientes AT e CT. Um aumento de 2,6 vezes foi visto no percentual dessas células entre CE e CT e de 4 vezes entre PTxCT. Salhi *et al.* (2008) apresentaram valores semelhantes aos nossos pacientes AT e PT. Esses resultados sugerem um controle da resposta imunológica, com essas células atuando na mediação de uma resposta polarizada do tipo 1 e conseqüentemente influenciando na imunopatologia da doença. Segundo Mendez *et al.* (2004) um tênue equilíbrio entre células regulatórias e efectoras é responsável pela manutenção da persistência do parasito, um estímulo antigênico importante na imunidade. Um pequeno número de parasitos permanece no local da lesão após o controle da infecção, e essa

persistência parasitária, mediada principalmente por células Treg, pode ser necessária para manutenção de uma imunidade protetora das células T, situação conhecida como imunidade concomitante (COUTINHO *et al.*, 2002; NYLEN; GAUTAM, 2010)

Ao analisarmos o percentual de linfócitos T CD4⁺ em culturas de PBMC após estimulação com diferentes antígenos, observamos um percentual superior e significativo comparando os estimulados AT aos valores do grupo controle. Ao comparamos PT versus controles também observamos valores significativos após estimulação com as frações antigênicas e com PHA. Já os pacientes CE apresentaram percentuais levemente superiores aos controles, no entanto sem diferença significativa. Da-Cruz *et al.* (1994) sugerem que os linfócitos T CD4⁺ parecem capazes de induzir perfis opostos, dependendo da sua produção de citocinas. Já Bottrel *et al.* (2001) demonstraram que em pacientes com lesões ativas e naqueles que se recuperaram, as células leishmania-reativas eram T CD4⁺. No presente estudo, os resultados sugerem a participação dos linfócitos T CD4⁺ tanto na patologia da doença, quanto na sua cura.

O exame de T CD8⁺ nas culturas, indicou uma diminuição do percentual dessas células AT, mas com um aumento significativo após o tratamento. Os pacientes CE apresentaram valores superiores de linfócitos T CD8⁺ em relação aos AT, sendo esses valores também significativos com o grupo CT ao se estimular as culturas com PHA e antígeno INS. Os linfócitos T CD8⁺ vêm sendo implicados no controle da infecção de LTA, e diversos autores já relataram seu aumento em pacientes que se curam, sugerindo o seu papel por modulação da atividade das células T CD4⁺, por efeito citolítico direto em macrófagos parasitados ou mesmo com efeitos regulatórios (BELKAID, 2007; COUTINHO *et al.*, 1996; DA-CRUZ *et al.*, 1994, 2002, 2005; RUIZ; BECKER, 2007; TOLEDO *et al.*, 2001).

Ao comparamos o percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em ensaios *ex vivo* e de cultura de PBMC após estimulação com as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* não foi observada diferença significativa no percentual de células T CD4⁺ entre os grupos estudados. Ao se comparar o percentual de T CD8⁺ na situação *ex vivo* com as células estimuladas com a fração antigênica solúvel, insolúvel e na comparação entre grupos foi observada diferença significativa, com aumento do percentual de células T CD8⁺ em pacientes PT. As células T CD8⁺ *leishmania* específicas são geradas durante a infecção e são importantes para produção de IFN- γ e para citototoxicidade contra macrófagos infectados (RUIZ; BECKER, 2007). Kemp *et al* (1999) mencionam que casos de infecção por *L. (V) braziliensis* em recuperação apresentavam aumento no percentual das células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ . O resultado reflete a importância das células T CD8⁺ na cura da doença

e a estimulação de células de memória pelas frações antigênicas testadas, uma vez que o seu maior percentual só foi observado após estimulação. Isso revela que qualquer antígeno candidato a vacina deve elicitar uma resposta T CD8⁺ associada a T CD4⁺ *leishmania* específica (DA-CRUZ *et al.*, 1994).

Foi observada ainda uma diminuição na razão de células T CD4⁺/CD8⁺ dos pacientes AT para o PT. Isso significou que o percentual de células T CD4⁺ diminuiu e que os T CD8⁺ aumentaram proporcionalmente e significativamente após o tratamento quimioterápico. Já os pacientes CE apresentaram a menor razão T CD4⁺/CD8⁺, com uma proporção de CD4⁺ comparável ao CT e uma proporção de CD8⁺ maior que PT e significativa ao se comparar com AT. Coutinho *et al* (1998) trabalhando com formas promastigotas de *L (V.) braziliensis* também notou um aumento de T CD8⁺ e diminuição de T CD4⁺, ambos significativos, após o tratamento quimioterápico, com conseqüente diminuição da razão CD4⁺/CD8⁺. Esses resultados confirmam e reforçam a hipótese de vários autores de que um balanço entre a proporção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ seria importante para cura (COUTINHO *et al.* 1998; DA-CRUZ *et al.* 1994, 2002; MENDOÇA *et al.* 1995).

É ainda importante destacar que o tratamento com antimoniais promove uma alteração na resposta do hospedeiro ao parasito, seja por sua destruição direta ou por aumentar a capacidade do hospedeiro em combater o mesmo. Apesar disso, estudos feitos por DA CRUZ *et al.* (1994) mostraram que as mudanças observadas no percentual de T CD4⁺ e CD8⁺ não deveriam ser associadas com o antimonial apenas. Foram testadas células de pacientes após o tratamento frente à estimulação com *T. gondii* e não se percebeu diferenças no percentual dos linfócitos, demonstrando que essa era uma resposta *leishmania* específica. Em nosso trabalho, o estudo *ex vivo* das células T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ dos pacientes também não demonstrou diferença significativa, sendo vista apenas após estimulação antigênica.

No presente estudo, os mitógenos PHA e PMA/IONO foram capazes de induzir uma resposta imune com produção de citocinas. A produção de IL-10, IL-4 e IFN- γ pelas células T CD4⁺ foi semelhante entre a PHA e PMA/Ionicina, assim como a de IL-10 e IL4 por T CD8⁺. A PHA estimulou principalmente a produção de citocinas de um perfil 2 em pacientes AT e de um perfil do tipo 1 em pacientes CE e PT. A PHA é um mitógeno policlonal que tem sido amplamente utilizada em estudos *in vitro* de ativação de células. Induz mitose por um mecanismo que é dependente de TCR e nem todas as células T sofrem esse processo (ABBAS; LICHTMAN, 2005; REIS *et al.*, 2006). O estímulo com PMA/Ionicina também apresentou um perfil Th2 na produção de suas citocinas AT, e um perfil Th1 nos pacientes PT e CE. PMA e ionicina são estímulos de ativação muito poderosos, atuando na proteína

quinase C e no influxo de cálcio, sendo o tempo de incubação 4-6 horas adequado para visualização da maioria das citocinas, já que incubações extensas (>24h) podem levar a morte celular (PALA *et al.*, 2000, BARAN *et al.*, 2001).

O resultado reflete a capacidade de PBMCs de pacientes e controles em produzir citocinas na presença de estímulo mitogênico. Esse tipo de análise é importante para avaliar a capacidade celular de resposta frente a antígenos inespecíficos, e serviu como controle positivo para o nosso estudo, já que os mitógenos refletem o perfil global de produção das PBMC através da sua ativação policlonal (SUNI *et al.*, 2005; PALA *et al.*, 2000).

A maior aplicabilidade dos ensaios de avaliação da funcionalidade celular é o monitoramento de células antígeno-específicas (T de memória), presentes em baixa concentração no sangue periférico. Segundo Suni *et al.* (2005), isso não pode ser feito com precisão em ensaios com apenas estimulação mitogênica, onde a produção dessas células pode ficar perdida no meio de produções inespecíficas. Esse fato destaca a importância de uma estimulação antígeno específica.

A produção de citocinas, utilizando-se estimulação antígeno-específica, já foi avaliada por diferentes grupos. Castellano *et al.* (2009), Gomes-Silva *et al.* (2007), Leopoldo *et al.* (2006), Da-Cruz *et al.* (2002), Coutinho *et al.* (1996), demonstraram que antígenos de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* íntegros ou sonicados eram capazes de induzir diferentes níveis de resposta imune celular, com a produção de citocinas em PBMC de pacientes. Telino *et al.* (2005) estudando antígenos de *L. (V.) braziliensis* e de *L. amazonensis*, viram que todos foram capazes de estimular a produção de IFN- γ . Esse grupo destacou que estudos em busca de moléculas antigênicas são relevantes para identificação de novas subunidades candidatas a vacinas e alvos para imunoterapia. Isso reforça a importância de nosso estudo na busca de caracterizar imunologicamente a fração solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*.

Trabalhos anteriores, realizados por nosso grupo, com ambas às frações aqui estudadas demonstraram que o soro de pacientes com LTA ativa, PT e CE foram capazes de reconhecer antígenos da fração antigênica solúvel (30 kDa) e insolúvel (19 kDa). Diante dos resultados, sugeriu-se que esses antígenos poderiam ser utilizados como testes diagnósticos (BRITO *et al.*, 2000; 2001). Em outros trabalhos, também demonstramos o potencial de estimulação antigênica das frações solúvel e insolúvel, e a sua capacidade de provocar linfoproliferação e estimulação da produção de citocinas Th1 e Th2 em PBMC de pacientes, mensuradas através de ensaios com incorporação de Timidina H³ e ELISA (REIS, 2007, REIS *et al.*, 2009; SOUZA, 2010).

O presente trabalho demonstrou que AT os pacientes produzem um perfil de citocinas predominantemente Th2 após estimulação das culturas com a fração antigênica solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. Ao comparar a evolução dos pacientes AT, PT e CE, observa-se uma maior e significativa produção das citocinas IL-10 e IL-4 por linfócitos T CD4⁺ em pacientes AT. Uma inversão desse quadro, com maior produção de IFN- γ e TNF- α foi vista após o tratamento, sendo o IFN- γ principalmente produzido por linfócitos T CD8⁺ e o TNF- α por T CD4⁺. Já os pacientes curados espontaneamente, apresentam uma predominância do perfil do tipo 1 com uma produção de IFN- γ e TNF- α . No entanto, ainda com produção de citocinas Th2. Os pacientes PT apresentaram resultados semelhantes aos CE, sugerindo que esse seja um perfil imunológico associado com cura. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos importantes no meio reforçando a importância da resposta do tipo 1 na evolução para cura e imunidade na doença, além da presença da resposta de citocinas inibitórias como contrabalanço e controle de uma imunopatologia exacerbada (BARATA-MASINI *et al.*, 2007; DA-CRUZ *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 1999).

A resposta celular mediada por células T tem um papel central na resposta do hospedeiro a patógenos intracelulares, e um bom prognóstico da LTA está relacionado com o predomínio de um perfil do tipo 1. Esse fato foi confirmado em nosso estudo. Um perfil do tipo 1 leva a produção de IFN- γ , TNF- α e a ativação dos macrófagos ativados por parasitos com a síntese do NO (ANTONELLI *et al.*, 2005; BARATTA-MASINI *et al.*, 2007). A resposta imune desenvolvida pelos pacientes contra os antígenos estudados, principalmente o antígeno solúvel, pode ser importante para o entendimento dos mecanismos de uma resposta imune protetora e patológica.

Trabalhos correlacionam a participação das citocinas IL-10 e IL-4 com a evolução da LTA, tendo sido demonstradas em lesões de pacientes, e relacionados com a diminuição da produção de IFN- γ e desativação de macrófagos (AJDARY *et al.*, 2000; BOURREAU *et al.* 2009; SALHI *et al.*, 2008). Isso fortalece a idéia do papel fundamental dessas citocinas no desenvolvimento das lesões, à medida que nesse estudo vemos suas diminuições quando os pacientes evoluem para cura.

A IL-10 pode inibir a produção de intermediários reativos do nitrogênio por macrófagos ativados por IFN- γ ; reduzir a produção de IL-12 e TNF por macrófagos ativados; desviar a resposta Th para um perfil Th2 através de atuação em moléculas co-estimulatórias dos APC; suprimir a proliferação de linfócitos T e apresentação antigênica, além de atuar em sinergia com o TGF- β para inibir a atividade microbicida dos macrófagos (AJUDARY *et al.*, 2000; BOTTREL *et al.*, 2001; CAMPANELLI *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 1999; SALHI *et al.*,

2008). Estudos de Salhi *et al* (2008) com pacientes infectados por *L (V.) braziliensis* demonstraram que IL-10 estava fortemente associado com lesões ativas em cultura de PBMC e que era produzido principalmente por monócitos e células Treg, sugerindo que essas células são importantes reguladoras da infecção por *Leishmania*. Nosso resultado evidencia também o papel do IL-10 como citocina imunoreguladora que, por estar presente em diversas fases, deve ser mais investigada. A secreção de IL-10 por células Th1 é um mecanismo auto-regulatório evoluído para minimizar a imunopatologia das células T (NYLÉN; GAUTAM, 2010). A produção de IL-10 tem sido muito relacionada às células T reg (BELKAID *et al.* 2007; BITTAR *et al.*, 2007;) e na análise *ex vivo* do presente trabalho, percebeu-se um aumento significativo na expressão de células T CD25⁺ (perfil de Treg) por todos os grupos de pacientes. Esse resultado sugere a participação dessas células em mecanismos imunorregulatórios e da sua importância para o controle e patologia da LTA, provavelmente também sendo as principais responsáveis pela produção de IL-10 observada.

A IL-4 é uma citocina que define o perfil Th2. Observa-se no presente trabalho a sua produção AT, principalmente por T CD4⁺ de maneira significativa quando comparada a produção dos controles. Essa é uma citocinas importante, que já demonstrou a inativação de macrófagos inflamatórios e a regulação da indução de células Th2, em adição à inibição de células Th1 (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; KAMALI-SARVESTANI, 2006). A IL-4 inibe o desenvolvimento da resposta Th1 via numerosos mecanismos, incluindo a regulação negativa da cadeia IL12Rβ2 e da função regulatória do fator de transcrição T-bet, que controla a expressão de IFN-γ (O’GARRA *et al.*, 2004). Além disso, a IL-4 demonstrou aumentar o crescimento das *leishmanias* (BITTAR *et al.*, 2007; KAMALI-SARVESTANI, 2006) e foi implicada com a persistência das lesões em pacientes infectados com *L. major*, sendo produzida principalmente por T CD4⁺ (BOTTREL *et al.*, 2001).

Em nosso estudo observa-se um predomínio de uma resposta Th2 antes do tratamento quimioterápico, e paciente com um tempo de evolução clínica de 1,6 meses. Devido à captação precoce dos pacientes, foi possível realizar uma avaliação dos mesmos no estágio inicial da doença e imunossupressão. A maioria dos trabalhos com LTA demonstram um perfil misto Th1/Th2 em pacientes com lesão ativa (BOTTREL *et al.*, 2001; CASTELLANO *et al.*, 2009; COUTINHO *et al.*, 1996; DA-CRUZ *et al.*, 2002; GOMES-SILVA *et al.* 2007; PIRMEZ *et al.*, 1993; SALHI *et al.*, 2008; TOLEDO *et al.*, 2001;). No entanto, esses pacientes apresentam uma evolução de lesão em torno de 3 meses, quando já é possível observar um mudança para o perfil Th1. Em estudos com *L (V.) braziliensis* foi visto que na LTA precoce (<60dias) se observa uma produção preferencial de IL-10 e uma baixa ou

mesmo ausente produção de IFN- γ . Esse padrão depois evolui para um perfil de citocinas predominantemente Th1, onde os pacientes apresentam produção de IFN- γ e linfoproliferação (BARATA-MASINI *et al.* 2007, GOMES-SILVA *et al.* 2007; ROCHA *et al.* 1999; SALHI *et al.*, 2008; SCHRIEFER *et al.*, 2008). Nossos resultados e o dos outros grupos sugerem que indivíduos susceptíveis, logo após a exposição ao parasito, desenvolvem uma resposta imunológica do tipo 2, que permite a sobrevivência e crescimento parasitário e o desenvolvimento da lesão. Com o avanço da doença, essa resposta muda para um perfil do tipo 1, ativando macrófagos o que leva ao controle do crescimento parasitário e progressão da doença. Sendo assim, é possível que o desenvolvimento da doença dependa de uma desregulação imunológica temporária durante as fases iniciais (BARATA-MASINI *et al.*, 2007; REINTHINGER *et al.*, 2007).

No que concerne as citocinas do perfil 1, IFN- γ e TNF- α , vimos uma baixa produção AT, principalmente de IFN- γ , sem diferença com os controles. Houve um aumento significativo PT, ao se considerar TNF- α e IFN- γ , sendo este último só quando estimulado com a fração antigênica solúvel. É interessante notar que os pacientes CE apresentam o mesmo perfil, mesmo na ausência de tratamento quimioterápico. O IFN- γ secretado pelas células Th1 é a citocina mais potente na ativação macrófágica, levando a resistência do hospedeiro na infecção pelos parasitos de *Leishmania* e estando associada à cura (BOTTREL *et al.*, 2001). Essa citocina também estimula a expressão do MHC em células apresentadoras de antígenos (SACHDEVA; ASTHANA, 2007).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que pode estar envolvida no controle da multiplicação parasitária nas infecções por *Leishmania*, já tendo sido demonstrada que é um grande ativador do NF- κ B para ativação de macrófagos. Além disso, incrementos no nível de TNF- α foram desencadeados pela terapia com antimonial (KOCYIGIT *et al.*, 2002). No entanto, uma maior produção dessa citocina também pode ser nociva para o hospedeiro (BACELLAR *et al.*, 2002). Estudos realizados por Ribeiro-de-Jesus *et al.* (1998), demonstraram que pacientes tratados com antimoniais em associação com drogas que possuíam a capacidade de diminuir o mRNA de TNF- α se curavam mais rapidamente. Num teste duplo cego realizado por Machado *et al.* (2007), a adição do inibidor de TNF- α (Pentoxifilina) no tratamento padrão com antimoniais foi mais efetivo do que antimonial com placebo, reduzindo o tempo de cura na leishmaniose mucosa. Apesar disso, a produção de TNF- α é muito importante para que se tenha a eliminação parasitária, embora sua produção excessiva possa contribuir para dano tecidual e formação da lesão (CASTELLANO *et al.*, 2009; RITTER *et al.*, 2004).

Portanto, IFN- γ e TNF- α são citocinas relacionadas com uma melhor resposta imunológica e muitos autores as correlacionam com a cura, visto que ambas atuam em sinergia para promover a ativação macrofágica com produção de NO e conseqüente eliminação do parasito (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; CASTELLANO *et al.*, 2009; NYLEEN; GAUTAM, 2010;). Embora não exista nenhum teste clínico ou laboratorial que prediga quais pacientes irão responder ou falhar ao tratamento com antimoniais, é provável que pacientes que produzam altos níveis de TNF- α e IFN- γ possuam um melhor prognóstico de cura em infecções com *L. (V.) braziliensis*.

Ao considerarmos a razão IFN- γ /IL-10, sugerido por Gomes e Silva *et al.* (2007) como um parâmetro útil para se prever a evolução clínica dos indivíduos infectados por *L. (V.) braziliensis*, observamos que AT a razão foi inferior a 1, e que após o tratamento essa relação subia, sendo superior a 1 principalmente nos linfócitos T CD8⁺. Pacientes CE e o grupo controle também apresentaram resultados semelhantes aos pacientes PT, com valores superiores a 1, principalmente por linfócitos T CD8⁺. Segundo Antonelli *et al* (2005), 90% dos pacientes com LTA se curam após o tratamento com antimoniais, o que indica o desenvolvimento tardio de uma resposta imune adequada e benéfica, também descrita por outros autores (BITTAR *et al.*, 2007; SALHI *et al.*, 2008, SCHRIEFER *et al.*, 2008). Em áreas endêmicas de *L. (V.) braziliensis* pacientes curados espontaneamente já foram documentados apresentando essa resposta imune mesmo sem o tratamento (BITTAR *et al.*, 2007; GOMES-SILVA *et al.*, 2007). Esse resultado reforça a importância da resposta do tipo 1, e demonstra que ela é necessária para o controle da multiplicação da leishmania e sua disseminação.

Entretanto, a produção de IL-10 por T CD4⁺ em pacientes PT quando estimulado com ambas as frações antigênicas e do CE quando estimulados com a fração antigênica solúvel não foi associada com baixa produção de IFN- γ e TNF- α . Isso indicou uma imunoregulação coordenada das células T produtoras de citocinas protetoras e potencialmente patogênicas, capazes de levar a resolução da infecção. Já foi reconhecido que células humanas Th1 podem também produzir IL-10 (GOLLOB *et al.*, 2008).

Sendo assim, apesar de uma resposta do tipo I ser crítica para o controle da leishmaniose, a perda de uma modulação apropriada é a responsável pela imunopatologia (SCHRIEFER *et al.*, 2008). Portanto, conforme evidenciado pelos nossos pacientes CE e PT, um balanço adequado entre as respostas que induzam a atividade leishmanicida, aquelas que induzem a patologia, e aquelas que mantenham a persistência parasitária, pode ser o tipo de resposta mais desejado contra a infecção por *L. (V.) braziliensis*.

Estudos avaliando a resposta das células T a antígenos totais dos parasitos são tão importantes quanto os estudos das respostas das células T a peptídeos ou epítomos derivados de antígenos de *Leishmania* (REIS *et al.*, 2009). Como trabalhamos com frações antigênicas, e não com o antígeno total do parasito, esse fato pode ser responsável pelas diferenças observadas na avaliação da resposta imunológica dos pacientes, indicando diferenças na antigenicidade das frações e na sua capacidade de estimular células T de memória. Isso reforça a importância de caracterizar antígenos para futuros investimentos em testes prognósticos e vacinas.

Os nossos antígenos apresentaram a capacidade de estimular a resposta imunológica nos linfócitos dos indivíduos estudados, sendo o antígeno solúvel o maior responsável pelas diferenças significativas que observamos entre pacientes antes e após o tratamento, assim como comparando com aqueles curados espontaneamente. A fração antigênica insolúvel também foi capaz de induzir uma resposta imune específica nas PBMC dos pacientes.

O tratamento dos pacientes pode ser beneficiado por intervenções imunológicas se o papel exato dos subtipos das células T na doença e resistência for esclarecido (AJUDARY *et al.*, 2000). No presente trabalho, não foi observada no sangue periférico dos pacientes diferenças significativas na expressão de CD3⁺ e CD4⁺ pelos grupos AT, PT, CE, CT. Embora tenha sido visto um aumento na expressão de CD8⁺ em pacientes PT e CE, em relação ao CT e AT, este não foi significativo. O percentual de linfócitos T CD8⁺ *ex vivo* apresentou diferença significativa ao se comparar com o percentual dos mesmos após cultura com as frações antigênicas e entre grupos, indicando a importância dos mesmos na resolução da infecção e uma resposta por células T de memória antígeno específica. Além disso, em culturas *ex-vivo* foi observado o aumento na expressão de CD25⁺ em pacientes AT, PT e CE em relação aos CT e de PT em relação a AT. Nas culturas, observamos uma predominância do perfil do tipo 2 e de linfócitos T CD4⁺ antes do tratamento de pacientes com LTA. Após o tratamento, vimos um aumento significativo dos linfócitos T CD8⁺ e uma maior produção das citocinas do tipo 1. No entanto, foi observada uma produção ainda significativa de IL-10, que associado ao aumento da expressão de CD25⁺ sugere a existência de mecanismos regulatórios. Com o aumento dos linfócitos T CD8⁺ e diminuição dos T CD4⁺ vimos uma diminuição na razão CD4⁺/CD8⁺.

O padrão imunológico observado parece estar associado com a cura e/ou proteção na LTA, e sugere ainda existência de células T de memória e de mecanismos imunoregulatórios, provavelmente por células Treg. Estes resultados serão úteis na determinação de um prognóstico de doença ativa e dos mecanismos necessários para sua evolução para cura. O

resultado observado pode ser um importante parâmetro para futura seleção de antígenos candidatos a vacina e testes prognósticos, através do desenvolvimento e manutenção de um perfil imunológico protetor.

Os estudos do nosso grupo continuarão com uma investigação mais aprofundada dos perfis celulares encontrados nesses pacientes e das células Th1, Th2, Treg, T duplo negativas ($CD3^+CD4^-CD8^-$) e Th17. Também incluirão análises genéticas com estudo de polimorfismos. Ao caracterizar a resposta imuno-genética desses pacientes frente às frações antigênicas, contribuiremos com as investigações para futuras intervenções imunológicas, testes prognósticos e imunização.

8. CONCLUSÕES

- a) Não ocorreram modificações significativas no perfil fenotípico das células T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ *ex vivo* nas populações celulares no sangue periférico dos pacientes após o tratamento ou cura espontânea. Isso ressalta a importância de uma estimulação antigênica para se avaliar adequadamente os perfis celulares;
- b) O aumento significativo na expressão do CD25⁺ nos linfócitos do sangue periférico de pacientes AT, PT e CE em relação ao controle e de PT em relação à AT, sugere a existência de mecanismos imunoregulatórios na infecção por *Leishmania (V.) braziliensis*;
- c) A presença e a liberação da citocina inibitória IL-4 e regulatória IL-10 por pacientes AT e a liberação de TNF- α e IL-10 em paciente PT e CE, mostram, respectivamente, a contribuição dos linfócitos T CD4⁺ tanto com a patogênese no início da infecção, quanto com a cura na LTA;
- d) A produção de IFN- γ pelo grupo PT e CE e uma estimulação específica das células T de memória PT, mostram a importância dos linfócitos T CD8⁺ na cura e proteção da LTA;
- e) As frações antigênicas solúvel e insolúvel foram capazes de induzir uma resposta imunológica específica, provavelmente por células T de memória, e os resultados observados são um importante parâmetro para futuros estudos com e seleção de antígenos candidatos a vacina e testes prognósticos;
- f) Observamos uma imunossupressão temporária na fase inicial da leishmaniose, com predominância de um perfil Th2, indicando a sua ligação com a progressão da doença. Após o tratamento ou cura espontânea, o padrão imunológico observado sugere a existência de uma resposta do tipo 1 e de células T CD8⁺. Esse perfil é muito importante para a cura/controle da infecção, desde que existam mecanismos imunoregulatórios para evitar a imunopatologia. No presente estudo, esta imunoregulação foi sugerida pela existência de células T CD25⁺ nos ensaios *ex vivo* e pela produção significativa de IL-10 nas culturas. Essas respostas parecem estar associadas com a cura e/ou proteção na LTA.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AJDARY, S. M. H. *et al.* Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. **Infection and immunity**, Washington, v. 68, n. 4, p 1760-1764, 2000.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, Nova Iorque, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

ANDRADE, M. S. *et al.* Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 229-233, 2005.

ANTONELLI, L. R. V. *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, Amsterdam, v.101, p. 226-230, 2005.

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

AUTISSIER, P. *et al.* Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. **Cytometry Part A**, Malden, v. 77, n. 5, p. 410-419, 2010.

BACELLAR, O. *et al.* IL-17 Production in Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of infectious disease**, Oxford, v.200, n.1, p. 75-78, 2009.

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

BARAN, J. *et al.* Three-Color Flow Cytometry Detection of Intracellular Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Comparative Analysis of Phorbol Myristate Acetate-Ionomycin and Phytohemagglutinin Stimulation. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.8, n. 2, p. 303-313, 2001.

BARATTA-MASINI, A. *et al.* Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 12, p. 839-849, 2007.

BASANO S. A.; CAMARGO L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, p.328-37, 2004.

BELKAID Y. Regulatory T cells and infections: a dangerous necessity. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 7, p. 875-888, 2007.

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

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

BETTELLI, E. *et al.* Induction and effector functions of Th17 cells. **Nature**, Londres, v. 453, p.1051-1057, 2008.

BITTAR, R. C. *et al.* T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rios de Janeiro, v. 102, n 5, p. 625-30, 2007.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, Malden, v. 173, p. 17-26, 2000.

Boletim Eletrônico Epidemiológico, Brasília, DF, ano 10, n. 2, 2010.

BOTELHO A. C.; MAYRINK, W.; OLIVEIRA R. C. Alterations in phenotypic profiles of peripheral blood cells from patients with human American cutaneous leishmaniasis following treatment with an antimonial drug and a vaccine. **Acta Tropica**, Amsterdam, V. 12, n. 2, p. 143-148, 2009.

BOTTREL, R. L. A. *et al.* Flow Cytometric Determination of Cellular Sources and Frequencies of Key Cytokine-Producing Lymphocytes Directed against Recombinant LACK and Soluble *Leishmania* Antigen in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 5, p. 3232 – 3239, 2001.

BOURREAU, E.; RNET, C.; DARCISSA, C. E. *et al.* Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. **Infection and Immunity**, Washington, 77(4):1465-74, 2009.

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

BRANDÃO-FILHO, S. P. *et al.* Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 180p., 2007.

BRITO, M. E. F. *et al.* Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, Malden, v. 14, n. 10, p. 1-9, 2009.

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

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

CAMPANELLI, A. P. *et al.* CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic of natural regulatory T cells. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, n.193, v. 1313-1322, 2006.

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

CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. **Human Immunology**, New York, v. 70, n. 6, p. 383-390, 2009.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 5, p. S7-S16, 2007.

CHOI, B. S; KROPF P. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization *ex vivo* and *in vitro*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 199-209, 2009.

CLEM, A. A current perspective on leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 124-126, 2010.

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

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

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

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

D'OLIVEIRA JUNIOR, A. *et al.* Evaluation of IFN- γ and TNF- α as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35(1): 7-10, 2002.

DA-CRUZ, A. M. *et al.* Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. **The British journal of dermatology**, Derby, v. 153, n. 3, p. 537-543, 2005.

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

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

DE ROSAL, S. C.; BRENCHLEY, J. M. ; ROEDERER, M. Beyond six colors: A new era in flow cytometry. **Nature Medicine**, Londres, v. 9, n. 1, p. 112 – 117, 2003.

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

FARIA, A. M. C. *et al.* Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging. **Neuroimmunomodulation**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 4-6, p. 365-79, 2008.

GAAFAR, A.; VERESS, B.; PERMIN, H. *et al.* Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **Clinical Immunology**, Boston, v. 91, n.3, p. 314-320, 1999.

GOLLOB, K. J. *et al.* Immunoregulatory mechanisms and CD4⁺CD8⁻ (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: A balancing act between protection and pathology. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 8, p. 1338-1343, 2008.

GOMES-SILVA, A. *et al.* Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical and Experimental Immunology**, Malden, v. 149, p. 440–444, 2007.

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

GONZÁLEZ, U. *et al.* Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Review**, Londres, v. 15, n. 2, 2009.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, Londres, v.8, p. 419-433, 2010.

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

JOHN, B.; HUNTER, C. A. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? **Science**, Washington, v. 321, n. 5891, p. 917-918, 2008.

KAMALI-SARVESTANI, E. *et al.* Gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. **Cytokine**, Londres, v. 35, n. 3-4, p. 159-165, 2006.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of global infectious diseases**, Mumbai, v. 2, p. 177-185, 2010.

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

KEMP M.; HANSEN M. B.; THEANDER T. G. Recognition of Leishmania antigens by T lymphocytes from non-exposed individuals. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, p. 2246-2251, 1992.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

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

LIPOLDOVÁ, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis, **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 7, p. 294-305, 2006.

MACHADO, P. R. L. *et al.* Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 44, p.: 788-793, 2007.

MEHTA, V. *et al.* Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in HIV, **Dermatology Online Journal**, California, v. 15, n. 4, p.: 9, 2009.

MENDEZ, S. *et al.* Role for CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in Reactivation of Persistent Leishmaniasis and Control of Concomitant Immunity. **Journal of Experimental Medicine**, Nova Iorque, v. 200, no. 2, p. 201-210, 2004.

MENDONÇA, C. F. S. *et al.* Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 53, n. 2, p. 195-201, 1995.

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

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NORTH, M. E. *et al.* Intracellular cytokine production by human CD4⁺ and CD8⁺ T cells from normal and immunodeficient donors using directly conjugated anti-cytokine antibodies and three-colour flow cytometry. **Clinical and experimental dermatology**, Nova Iorque v. 105, p. 517-522, 1996.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 135-146, 2010.

O'GARRA, A. *et al.* IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 114, n. 10, p. 1372-1378, 2004.

Organização Mundial de Saúde. **Cutaneous Leishmaniasis- Why are you neglecting me?** Geneva, 2007. Disponível em:
<http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng.pdf>. Acesso em janeiro de 2011.

Organização Mundial de Saúde. **Leishmaniasis**. Disponível em:
<<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em janeiro de 2011.

OUKKA, M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 66, p. 87-90, 2007.

PALA, P.; HUSSELL, T.; OPENSHAW, P. J. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 243, n. 1-2, p. 107-124, 2000.

PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, Washington, v. 321, p. 970-974, 2008.

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

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

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, Londres, v. 82, p. 649-657, 2006.

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

REIS, L. C. *et al.* Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, Hoboken, v. 23, p. 63-69, 2009.

REIS, L. C. **Caracterização da resposta imune celular em portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana antes e após tratamento quimioterápico**. 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.

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

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 7, p. 581-596, 2007.

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

RITTER, U. *et al.* The control of Leishmania (Leishmania) major by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. **Microbes and Infection**, Merced, v. 6, n. 6, p. 559-65, 2004.

ROBERTS, M. T. M. Current Understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, Edinburg, v. 75/76, p. 115-130, 2006.

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

ROCHA, P. N. *et al.* Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 180, n. 5, p. 1731-34, 1999.

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

RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, Oxford, v. 29, n. 12, p. 671-8, 2007.

SACHDEVA, N.; ASTHANA, D. Cytokine quantitation: technologies and applications. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 1, n. 12, p. 4682-95, 2007.

SALHI, A. *et al.* Immunological and Genetic Evidence for a Crucial Role of IL-10 in Cutaneous Lesions in Humans Infected with *Leishmania braziliensis*. **Journal of Immunology**, Nova Iorque, v. 180, p. 6139 – 6148, 2008.

SANTOS, D.O. *et al.* Leishmaniasis treatment- a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, Berlin, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2008.

SCHMIDT-WEBER, C. B.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Th17 cells in the big picture of immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 120, n. 2, p. 247-254, 2007.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Londres, n. 21, v. 5, p. 483-488, 2008.

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

SOUSA, A. Q. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis: a patient with 749 lesions. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol.10, n.3, pp. 230-230, 2006.

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

SOUZA, M. A. **Avaliação da produção *in vitro* de citocinas e de óxido nítrico na leishmaniose tegumentar americana ativa e após a cura clínica.** 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

STENGER, S.; RÖLLINGHOFF, M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Londres, v. 60, p. 43-46, 2001.

STOCKINGER, B.; VELDHOEN, M. Differentiation and function of Th17 cells. **Current Opinion in Immunology**, Londres, v. 19, p. 281-286, 2007.

SUNI, M. A.; MAINO, V. C.; MAECKER, H. *Ex vivo* analysis of T-cell function. **Current Opinion in Immunology**, Londres, v. 17, p. 434-440, 2005.

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

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

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

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

Apêndice A



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente

Projeto: “Caracterização imunofenotípica em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana”.

Eu,, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal do referido projeto é a investigação da resposta imunológica dos pacientes com leishmaniose tegumentar ativa, e após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico.

Como faço parte do grupo de pacientes, serei submetido a coleta de 40 ml de sangue venoso antes e 40 ml de sangue venoso após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico e a exames que incluirão a pesquisa direta; punção aspirativa e biópsia da borda da lesão ativa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos, podendo ser considerado isento de riscos.

Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema imunológico poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema imunológico participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecido por um participante do projeto. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

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

Estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com a equipe.

Assinatura do paciente ou menor

data

Assinatura do responsável

data

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

data

Endereço profissional: Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Moraes Rêgo, s/n°, Recife, fone: (81) 34215003.

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil.
Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.

Apêndice B

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente menor de 18 anos**

Projeto: “Caracterização imunofenotípica em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana”.

Eu,, concordo que meu filho participe voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal do referido projeto é a investigação da resposta imunológica dos pacientes com leishmaniose tegumentar ativa, e após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico.

Como faço parte do grupo de pacientes, serei submetido a coleta de 40 ml de sangue venoso antes e 40 ml de sangue venoso após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico e a exames que incluirão a pesquisa direta; punção aspirativa e biópsia da borda da lesão ativa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos, podendo ser considerado isento de riscos.

Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema imunológico poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema imunológico participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecido por um participante do projeto. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

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

Estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com a equipe.

Assinatura do paciente ou menor_____
data_____
Assinatura do responsável_____
data_____
Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ_____
data

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

Apêndice C



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle

Projeto: “Caracterização imunofenotípica em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana”.

Eu, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal do referido projeto é a investigação da resposta imunológica dos pacientes com leishmaniose tegumentar ativa, e após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico. Eu farei parte do grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos que não apresentam a doença e que servirão de comparação com os indivíduos doentes. Serei submetido a uma única coleta de 40 ml sangue venoso.

Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos, podendo ser considerado isento de riscos. Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema imunológico poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema imunológico participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco.

Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecido por um participante do projeto, sobretudo em relação a importância do grupo controle. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo. Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a utilização das informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade. Autorizo, também que o CPqAM/FIOCRUZ poderá estocar amostra biológica para posteriores estudos.

Estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com a equipe.

Assinatura do voluntário

data

Assinatura do responsável

data

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

data

Endereço profissional: Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Moraes Rêgo, s/n°, Recife, fone: (81) 34215003.

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil.Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>

Anexo A- Parecer do Comitê de Ética



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CPqAM/FIOCRUZ

Título do Projeto: "Caracterização da resposta imune celular em portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após cura clínica."

Pesquisador responsável: Valéria Rego Alves Pereira

Instituição onde se realizará o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 21/11/2005

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 60/05

Registro no CAEE: 0757.0.095.000-05

PARECER

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

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP, bem como o modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apresentado. Este parecer tem validade até 08 de março de 2009 e em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 08 de março de 2006

Ana Maria A. Santa

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

Observação:

- O referido parecer foi extraído do projeto, de modo que a análise dos pareceristas baseou-se nos fatos nele apresentados. Assim, **quaisquer modificações realizada** pelo Pesquisador responsável por esta pesquisa, devidamente identificado nas Folhas de Rosto e no Corpo do Projeto e **não submetida à nova avaliação a este Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/CPqAM)**, estará assumindo total responsabilidade pelo descumprimento da **Legislação vigente** que trata do assunto Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, e demais códigos Cíveis e Penais que garantam a proteção a vida humana e a cidadania daqueles que se sentirem lesados em quaisquer um de seus direitos.
- O pesquisador responsável deverá enviar ao CEP um relatório anual sobre o andamento do projeto.

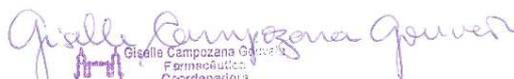
Anexo B - Prorrogação do parecer do Comitê de Ética



DECLARAÇÃO

Declaro para devidos fins que o projeto 60/05 – “Caracterização da resposta imune celular em portadores de leishmaniose tegumentar americana ativa após cura clínica”, aprovado neste comitê em março de 2006, tem a sua solicitação de prorrogação do Parecer de Aprovação concedida por mais três anos.

Recife, 08 de setembro de 2009.


Gisella Camposana Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Méd. SIAPE 8483-876
CPqAm / FIOCRUZ