

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

Marina de Assis Souza

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
CITOCINAS E DE ÓXIDO NÍTRICO NA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA
E APÓS CURA CLÍNICA**

Recife
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marina de Assis Souza

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *in vitro* DE CITOCINAS E DE ÓXIDO NÍTRICO NA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

Recife
2010

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S729a Souza, Marina de Assis.

Avaliação da produção in vitro de citocinas e de óxido nítrico na leishmaniose tegumentar americana ativa e após cura clínica / Marina de Assis Souza. — Recife: M. de A. Souza, 2010.

126 f.: il.

Dissertação (Mestrado acadêmico em saúde pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

Orientadora: Valéria Rêgo Alves Pereira.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Leishmaniose Cutânea - quimioterapia. 3. Citocinas. 4. Óxido Nítrico. I. Pereira, Valéria Rêgo Alves. II. Título.

CDU 616.993.161

Marina de Assis Souza

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *in vitro* DE CITOCINAS E DE ÓXIDO NÍTRICO NA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em ____/____/____.

Banca Examinadora

Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira
Orientadora (CPqAM/FIOCRUZ)

Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro
Examinador Titular Interno (CPqAM/FIOCRUZ)

Dra. Vladia Maria Assis Costa
Examinador Titular Externo (CCS-UFPE)

Aos meus pais, **Marleide e Alberto**, pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, **Felipe**.

Às minhas avós, **Lia** (*in memoriam*) e **Marina** (*in memoriam*).

Por todo o carinho, apoio e incentivo durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e forças.

Aos meus pais, Marleide e Alberto, e meu irmão, Felipe, por sempre apoiarem minhas escolhas, dando todo o suporte para chegar até aqui. Muito obrigada pelo amor, carinho e cuidado, em todos os momentos.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e à Coordenação do Mestrado em Saúde Pública.

À CAPES, CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Dra. Valéria Pereira, pelo voto de confiança a mim conferido para a execução deste trabalho. Agradeço também pela intensa orientação, grande amizade e apoio.

A Edileuza Brito por toda ajuda com a captação dos pacientes e pelos ensinamentos que ficarão para a vida inteira.

A Luiza Reis pela grande amizade. Agradeço demais por toda a sua ajuda sempre que precisei.

Um agradecimento mais que especial às minhas amigas do laboratório de Imunogenética do CPqAM, pelo convívio, ajuda e amizade. Vocês são ótimas!

Agradeço também a Lucas e Artur por todo apoio e amizade.

A Eduardo Henrique e Roberto Werkhäuser pela grande amizade, pelas palavras de incentivo e pelos momentos de descontração na hora do café. Admiro vocês de verdade.

À Dra. Silvia Montenegro, por ter me apresentado à Valéria. Obrigada pelo apoio e confiança.

Aos pacientes participantes deste estudo, sem os quais sua realização não seria possível.

À equipe do Núcleo de Vigilância e Saúde de Moreno, em especial Claudio e Lucinha, pela dedicação na busca pelos pacientes, apoio e amizade.

À Dra. Angela Rapela, médica dermatologista do grupo, pela assistência aos pacientes.

Aos bibliotecários do CPqAM, em especial a Mácia Saturnino e Mégine Carla, por toda ajuda quando necessária.

Aos meus queridos colegas do curso de mestrado, pelo ótimo convívio, companheirismo e pelas horas de descontração.

Um agradecimento especial aos meus amigos Romero Henrique, Karla Luna, Daniele Van Lume e Andréa Moraes (Sushi-Team). Obrigada por todas as palavras de apoio e incentivo e pelos ótimos momentos. A amizade de vocês é muito especial para mim!

Aos meus queridos amigos, por todo apoio em todos os momentos.

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o bom andamento e conclusão deste trabalho.

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

RESUMO

Estudos sugerem que há um importante componente imunológico na resposta à quimioterapia na leishmaniose tegumentar americana. Particularmente relevante é o estudo de pacientes curados espontaneamente, uma vez que podem desenvolver resposta imune protetora. Assim, este estudo teve como objetivos determinar a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10 por ELISA de captura e de óxido nítrico pela reação de Griess em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 14 pacientes com LTA ativa e um ano após o término do tratamento com Glucantime, além de 11 pacientes com cura espontânea da LTA e de 9 indivíduos sadios (controle). As células foram incubadas por 24h, 48h, 72h e 6 dias na presença dos mitógenos concanavalina A (2,5 μ g/ml), fitohemaglutinina (5,0 μ g/ml) e dos antígenos solúvel (AgSol, 1,25 μ g/ml) e insolúvel (AgIns, 2,5 μ g/ml) de *L. (V.) braziliensis*. Os resultados, expressos em pg/ml para o ELISA e em μ M para a reação de Griess, foram submetidos aos testes estatísticos (Wilcoxon e Mann-Whitney, $p < 0,05$). A produção de citocinas e de NO frente aos mitógenos apresentou diferenças estatísticas entre os grupos. IFN- γ foi significativamente produzida em resposta aos antígenos pelos grupos de pacientes em relação ao controle, com o AgIns estimulando maior produção em relação ao AgSol nos três grupos. Tanto antes como após a quimioterapia, os pacientes exibiram TNF- α sob estímulo de ambos os antígenos em concentrações significativas em relação ao grupo controle. Em resposta ao AgIns os pacientes tratados produziram níveis significativos de TNF- α em comparação aos curados espontaneamente. Além disso, o AgIns estimulou significativamente a produção de TNF- α em comparação com o AgSol nos pacientes antes e após o tratamento. Houve diferença significativa na produção de IL-2 em resposta ao AgIns pelos pacientes antes da quimioterapia em relação aos controles. Resultado semelhante nesses pacientes foi visto com IL-10 em resposta ao AgSol. Além disso, os mesmos pacientes produziram IL-10 em concentrações significativas em relação ao momento pós-tratamento. Níveis significativos de NO foram observados em resposta ao AgSol nos pacientes de cura espontânea em relação aos demais grupos. Sob estímulo do AgIns este grupo mostrou níveis de NO significativos em relação aos pacientes tratados e grupo controle. Resultado estatístico semelhante foi encontrado ao comparar os pacientes antes e após tratamento, bem como os de lesão ativa com os indivíduos sadios. Os resultados indicam uma resposta imune específica de PBMC dos pacientes em resposta aos antígenos. Sugere-se que o AgIns estimule uma resposta predominantemente inflamatória com produção de IFN- γ em pacientes com LTA e de TNF- α após tratamento. Por outro lado, o AgSol parece promover uma resposta reguladora com a participação de IL-10 e uma possível modulação autócrina na produção de NO em pacientes curados espontaneamente.

Palavras-chave: Leishmaniose Cutânea, Leishmaniose Cutânea – quimioterapia, Citocinas, Óxido Nítrico.

SOUZA, M. A. **Evaluation of *in vitro* cytokines and nitric oxide production in active american tegumentary leishmaniasis and after clinical cure.** 2010. Dissertation (Master's Degree in Public Health) – Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2010.

ABSTRACT

Studies suggest that there is an important immunological component in the response to chemotherapy in american tegumentary leishmaniasis. Particularly relevant is the study of spontaneously-healed patients, once they can develop protective immune response. Thus, this study had as objectives to determine IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10 production by capture ELISA and nitric oxide (NO) by the Griess reaction in peripheral blood mononuclear cells culture supernatants of 14 patients with active ATL and one year after the end of treatment, and also of 11 spontaneously-healed patients and 9 healthy individuals (control group). The cells were incubated for 24h, 48h, 72h and 6 days in the presence of the mitogens concanavalin A (2,5 μ g/ml), phytohemagglutinin (5,0 μ g/ml) and of the soluble (AgSol, 1,25 μ g/ml) and insoluble (AgIns, 2,5 μ g/ml) antigens of *L. (V.) braziliensis*. The results, expressed in pg/ml for ELISA and in μ M for Griess reaction, were submitted to statistical tests (Wilcoxon e Mann-Whitney, $p < 0,05$). Cytokines and NO production presented statistical differences among the groups. IFN- γ was significantly produced in response to the antigens by the groups of patients in relation to the control, with AgIns stimulating higher production in relation to AgSol in the three groups. Both before and after chemotherapy, the patients exhibited TNF- α in significant concentrations under stimulus of both antigens in relation to control group. In response to AgIns the treated patients produced significant levels of TNF- α in comparison to spontaneously-healed patients. Furthermore, AgIns significantly stimulated TNF- α production in comparison to AgSol. There was significant difference in IL-2 production in response to AgIns by the patients before chemotherapy in relation to the control group. Similar result in these patients was seen with IL-10 in response to AgSol. Moreover, the same produced this cytokine in significant concentrations in relation to the post-treatment moment. Significant NO levels were observed in response to in spontaneously-healed patients in relation to the treated patients and control group. Under AgIns stimulus the spontaneously healed individuals showed significant NO levels in relation to the treated patients and the control group. Similar statistic result was found when comparing the patients before and after treatment, as well as the ones with active lesions with the control group. The results indicate a specific immune response of PBMC from patients in response to the antigens. It suggests that AgIns stimulate a predominantly inflammatory response with IFN- γ production in patients with ATL and with TNF- α production post treatment. On the other hand, AgSol seems to promote a regulatory response with IL-10 participation and a possible autocrine modulation in NO production in spontaneously healed patients.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis, Cutaneous Leishmaniasis – chemotherapy, Cytokines, Nitric Oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Amastigotas.	17
Figura 2: Promastigotas.	17
Figura 3: Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	18
Figura 4: Formas clínicas da LTA.	19
Figura 5: SDS-PAGE de proteínas solúveis (1 e 2) e insolúveis (3 e 4) de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	43
Figura 6: Padronização da produção de IFN- γ por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno insolúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i>	45
Figura 7: Padronização da produção de TNF- α por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	46
Figura 8: Padronização da produção de TNF- α por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno insolúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	46
Figura 9: Padronização da produção de IL-2 por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	47
Figura 10: Padronização da produção de IL-2 por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno insolúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	48
Figura 11: Padronização da produção de IL-10 por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	49
Figura 12: Padronização da produção de IL-10 por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno insolúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	49
Figura 13: Produção de IFN- γ entre os grupos de pacientes com lesão ativa (Pcs AT), após o tratamento (Pcs PT), pacientes curados espontaneamente (Pcs CE) e grupo Controle, em resposta aos mitógenos ConA e PHA e antígenos solúvel e insolúvel.	51
Figura 14: Produção de TNF- α entre os grupos de pacientes com lesão ativa (Pcs AT), após o tratamento (Pcs PT), pacientes curados espontaneamente	53

(Pcs CE) e grupo Controle, em resposta aos mitógenos ConA e PHA e antígenos solúvel e insolúvel.

Figura 15: Produção de IL-2 entre os grupos de pacientes com lesão ativa (Pcs AT), após o tratamento (Pcs PT), pacientes curados espontaneamente (Pcs CE) e grupo Controle, em resposta aos mitógenos ConA e PHA e antígenos solúvel e insolúvel. 54

Figura 16: Produção de IL-10 entre os grupos de pacientes com lesão ativa (Pcs AT), após o tratamento (Pcs PT), pacientes curados espontaneamente (Pcs CE) e grupo Controle, em resposta aos mitógenos ConA e PHA e antígenos solúvel e insolúvel. 56

Figura 17: Padronização da detecção de nitrito produzido por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle após estímulo com o antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. 59

Figura 18: Padronização da detecção nitrito produzido por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle após estímulo com o antígeno insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. 60

Figura 19: Produção de NO entre os grupos de pacientes com lesão ativa (Pcs AT), após o tratamento (Pcs PT), pacientes curados espontaneamente (Pcs CE) e grupo Controle, em resposta aos mitógenos ConA e PHA e antígenos solúvel e insolúvel. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados dos pacientes com LTA ativa com relação à idade, sexo, localidade, forma clínica, número de lesões, evolução clínica, local das lesões, tamanho das lesões e ciclos de Glucantime® administrados.	40
Tabela 2. Dados referentes aos indivíduos curados espontaneamente, em relação a idade, sexo, localidade, número de cicatrizes, tempo de cicatrização e resultado da IDRМ.	42
Tabela 3. Análise de correlação entre a produção de TNF frente ao antígeno solúvel e a área das lesões de pacientes com LTA ativa.	57
Tabela 4. Análise de correlação entre a produção de IL-2 frente ao antígeno solúvel e o resultado da IDRМ em pacientes curados espontaneamente.	58
Tabela 5. Análise de correlação entre a produção de IL-2 frente ao antígeno insolúvel e o resultado da IDRМ em pacientes curados espontaneamente.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(L.)	<i>Leishmania</i>
(V.)	<i>Viannia</i>
ABTS	2,2'-azino-di[sulfato (6) de 3-etil benzitiazolina]
AgIns	Antígeno insolúvel
AgSol	Antígeno solúvel
ConA	Concanavalina A
CR	Receptores do Complemento
Cts	Controles
DOs	Densidades ópticas
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Reação de imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
kDa	kilodalton
L.	<i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LIT	Liver infusion tryptose
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NK	<i>Natural Killer</i>
NNN	McNeal, Novy & Nicole
NO	Óxido Nítrico
NO ²⁻	Radical Nitrito
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Metil-fenil-fluoreto
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Sb ⁵⁺	Antimonial Pentavalente
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SRL	Serviço de Referência em Leishmanioses
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
T CD4+	Linfócito T CD4+
T CD8+	Linfócito T CD8+
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T _{CM}	Célula T de memória central
T _{EM}	Célula T de memória efetora
TEMED	Tetrametil-etilenodiamino
Th1	Célula T helper tipo 1
Th2	Célula T helper tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β	Fator de necrose tumoral beta
Tw	Tween 20
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): Aspectos gerais	16
1.2 Formas clínicas da LTA	19
1.3 Diagnóstico	21
1.4 Tratamento	23
1.5 Resposta imunológica	24
2 JUSTIFICATIVA	30
3 PERGUNTA CONDUTORA	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 Geral	32
4.2 Específicos	32
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	33
5.1 Tipo de estudo	33
5.2 Descrição da população estudada	33
5.3 Considerações éticas	34
5.4 Obtenção dos antígenos solúvel e insolúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i>	34
5.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico	35
5.6 Obtenção de sobrenadantes de cultura	36
5.7 Dosagem das citocinas secretadas nos sobrenadantes de cultura	36
5.8 Dosagem de óxido nítrico	37
5.9 Análise estatística	37
6 RESULTADOS	39
6.1 Características da população estudada	39
6.1.1 Pacientes com LTA ativa	39
6.1.2 Pacientes curados espontaneamente	41
6.2 Perfil eletroforético dos antígenos solúvel e insolúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i>	43
6.3 Dosagem de citocinas secretadas em sobrenadantes de cultura	44
6.3.1 Padronização do ensaio de sobrenadante de cultura	44
6.3.1.1 <i>Interferon-gama</i>	44
6.3.1.2 <i>Fator de necrose tumoral-alfa</i>	46
6.3.1.3 <i>Interleucina-2</i>	47

6.3.1.4 <i>Interleucina-10</i>	49
6.3.2 Produção de citocinas na LTA ativa e após cura clínica	50
6.3.2.1 <i>Interferon-gama</i>	50
6.3.2.2 <i>Fator de necrose tumoral-alfa</i>	52
6.3.2.3 <i>Interleucina-2</i>	54
6.3.2.4 <i>Interleucina-10</i>	55
6.3.3 Associação entre mediadores imunológicos e dados clínicos	57
6.3.3.1 <i>Fator de necrose tumoral-α e tamanho de lesão</i>	57
6.3.3.2 <i>Interleucina-2 e resultado da IDRМ</i>	58
6.4 Dosagem óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura	59
6.4.1 Padronização da reação de Griess	59
6.4.2 Produção de óxido nítrico na LTA ativa e após cura clínica	61
7 DISCUSSÃO	63
8 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICE A – TCLE Pacientes	88
APÊNDICE B – TCLE Pacientes menores de 18 anos	89
APÊNDICE C – TCLE Grupo Controle	90
ANEXO A – Parecer CEP/CPqAM	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose tegumentar americana: aspectos gerais

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o homem, causadas por diversas espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Globalmente, estima-se que sejam notificados 1,5 a 2 milhões de casos, e acredita-se que 350 milhões de pessoas estejam sob risco de contrair a doença em todo o mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2003).

A forma tegumentar é endêmica em mais de 70 países, com 90% dos casos ocorridos no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Síria e Arábia Saudita (DESJEUX, 2004). Nas Américas, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) ocorre desde o Sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile (GONTIJO; CARVALHO, 2003). É considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas). Dessa forma, o homem adquire a infecção ao entrar em contato com áreas florestais onde existam as enzootias pelas diferentes espécies de *Leishmania*.

No Brasil, a doença tem assegurada a sua distribuição em todo o território, onde, atualmente, todos os Estados federativos têm registros da enfermidade (BRASIL, 2007). Cinco espécies do subgênero *Viannia* e uma do gênero *Leishmania* estão associadas à doença no país. *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie causadora de LTA no Brasil (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003) e, até o momento, única circulante em Pernambuco (ANDRADE et al., 2005; BRANDÃO-FILHO et al., 2003).

No Estado, a LTA incide em todas as regiões destacando-se a região da Zona da Mata com mais de 60% do total dos casos registrados (BRANDÃO-FILHO et al., 1999). Entre 1990 e 2000 foram notificados 3268 casos no Estado, e estima-se que nos últimos dez anos a transmissão da doença tenha aumentado dez vezes (BRITO et al., 2009). A ocorrência da LTA está relacionada com a exploração do homem a ambientes silvestres, construção de estradas e desmatamentos. Em geral, acomete indivíduos residentes em áreas florestais e periurbanas (ASHFORD, 2000).

A transmissão ocorre pela picada de fêmeas hematófagas de dípteros pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e ao gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo. No Brasil,

as espécies de vetores relacionadas com a transmissão da LTA causada por *L. (V.) braziliensis* são *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia complexa* na Bacia Amazônica (SOUZA et al., 1996), *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia intermedia* no Nordeste e Sudeste (ANDRADE et al., 2005; SOUZA et al., 2002).

Os reservatórios variam conforme a espécie de *Leishmania*, e incluem animais silvestres como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), marsupiais (*Didelphis marsupialis*) e roedores. Podem ser também considerados reservatórios da doença animais domésticos como cães, equinos e mulas. Na Zona da Mata Sul de Pernambuco, área endêmica para LTA, foram isoladas amostras de *L. (V.) braziliensis* em algumas espécies de roedores silvestres como *Bolomys lasiurus*, *Rattus rattus* e *Nectomys squamipes* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003).

A *Leishmania* apresenta-se sob as formas amastigota (Figura 1) e promastigota (Figura 2) durante o ciclo biológico (Figura 3). A amastigota caracteriza-se por ser imóvel, ovalada e é a forma intracelular obrigatória dos vertebrados. Já a promastigota é alongada, flagelada e móvel, desenvolvendo-se no intestino do inseto vetor. No sub-gênero *Leishmania*, que inclui espécies do complexo *mexicana*, as formas promastigotas multiplicam-se nas regiões média e anterior do intestino do flebótomo. Já no sub-gênero *Viannia*, que inclui espécies do complexo *braziliensis*, as formas promastigotas migram para as regiões anterior, média e posterior do intestino, colonizando o vetor (LAINSON; SHAW, 1998).

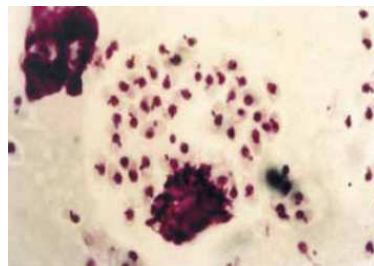


Figura 1. Amastigotas
Fonte: Brasil (2007)

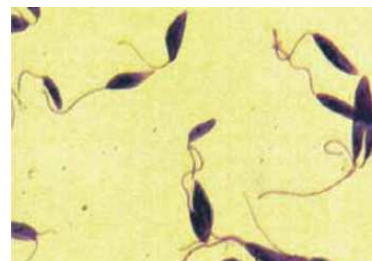


Figura 2. Promastigotas
Fonte: Brasil (2007)

A infecção começa quando um inseto infectado executa a hematofagia no hospedeiro vertebrado, inoculando as promastigotas infectantes na pele. Estas são internalizadas por células do sistema fagocitário mononuclear, transformam-se em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária, até que as células infectadas se rompem, ficando os parasitos livres na corrente sanguínea e capazes de infectar outras células fagocíticas. Quando o hospedeiro infectado é picado por outro inseto vetor, macrófagos parasitados por amastigotas são ingeridos. No intestino do inseto, os parasitos se transformam em promastigotas, que

alcançam o aparelho bucal, sendo inoculados em um novo hospedeiro, reiniciando assim o ciclo (REY, 2001).

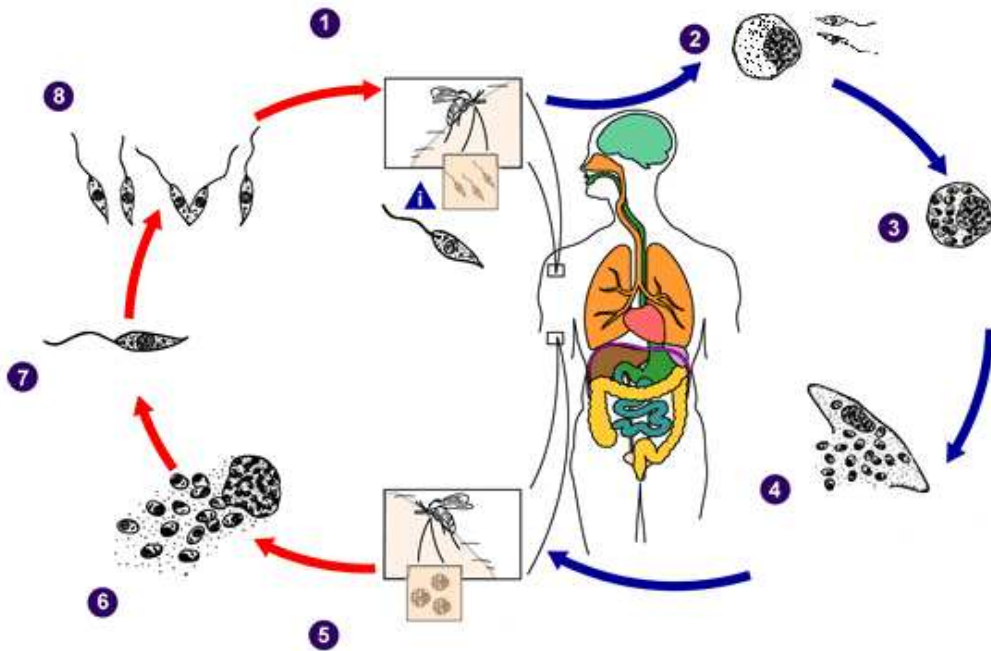


Figura 3. Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2009)

Nota:

- 1) Inseto infectado executa o repasto sangüíneo no hospedeiro, injetando promastigotas;
- 2) Promastigotas são fagocitadas por macrófagos;
- 3) Promastigotas se transformam em amastigotas no interior dos macrófagos;
- 4) Macrófagos se rompem, liberando as amastigotas, que infectam outras células;
- 5) Inseto ingere sangue infectado do homem;
- 6) Macrófagos contidos no sangue infectado se rompem, liberando as amastigotas;
- 7) Amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do inseto;
- 8) Promastigotas se multiplicam no intestino do inseto vetor; o inseto infectado executa o repasto sangüíneo, reiniciando o ciclo.

1.2 Formas clínicas da LTA

O aparecimento das formas clínicas da LTA (Figura 4) depende de fatores inerentes ao parasito, como virulência, tropismo e quantidade inoculada. Além disso, características do vetor, o estado imunológico e constituição genética do hospedeiro vertebrado também influenciam o resultado da infecção (ROGERS et al., 2002). O homem pode apresentar infecção subclínica ou manifestações que variam desde lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou difusas até lesões mucocutâneas agressivas e mutilantes (GOLLOB et al., 2008).

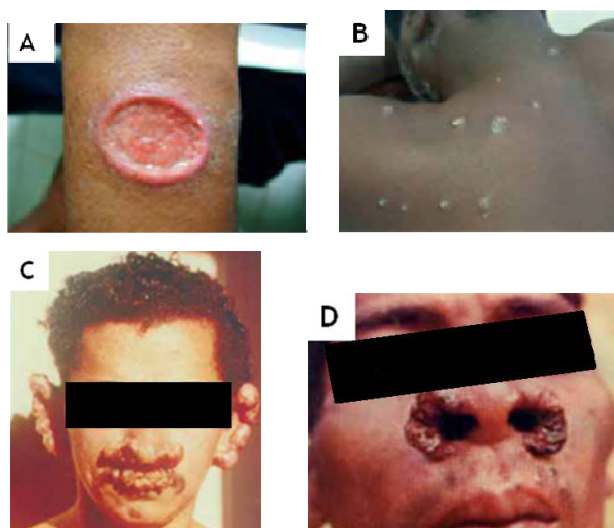


Figura 4: Formas clínicas da LTA

Fonte: Gontijo e Carvalho (2003)

Nota: A) forma cutânea localizada; B) forma cutânea disseminada; C) forma cutânea difusa; D) forma muco-cutânea.

Até o momento, seis espécies de *Leishmania*, pertencentes os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, foram identificadas no Brasil como causadoras da LTA humana: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, causadora das formas cutânea localizada e mucocutânea; *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) naiffi*, responsáveis pela leishmaniose cutânea localizada; e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsável pelas formas cutânea localizada e cutânea difusa (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Em 2002, Silveira et al. atribuíram a etiologia de casos de leishmaniose cutânea na Região Amazônica a uma nova espécie, *Leishmania (Viannia) lindenbergi*, caracterizada e diferenciada de espécies

conhecidas do subgênero *Viannia* pela combinação das técnicas de isoenzimas e anticorpos monoclonais.

A leishmaniose cutânea (LC) representa a manifestação clínica mais frequente, cujo período de incubação varia entre dez dias a três meses. De início, nota-se uma pápula ou nódulo no sítio de inoculação pelo mosquito infectado. A partir desta pápula, pode surgir uma lesão ou múltiplas em pequeno número, caracterizando a forma localizada, com tendência à cicatrização. Em casos mais raros, as lesões podem ser numerosas devido a múltiplas picadas do inseto ou por disseminação hematogênica, caracterizando a forma cutânea disseminada. As lesões apresentam aspectos variados e a infecção secundária bacteriana altera este aspecto, tornando-as mais inflamadas, dolorosas e purulentas (BRASIL, 2007; PINHEIRO, 2004).

A lesão típica da forma cutânea localizada apresenta-se sob forma habitualmente arredondada ou ovóide, com tamanho variável de alguns milímetros até alguns centímetros. Possui aspecto ulcerado com base infiltrada e firme, bordas bem delimitadas, elevadas e eritematosas, com fundo granuloso e avermelhado. Outras apresentações são encontradas, embora com menor frequência, tais como verrucosa, tuberosa, impetigóide e vegetante. Apresentam pouca quantidade de parasitos e boa resposta ao tratamento habitual ou tendência a regredir espontaneamente (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é caracterizada pelo aparecimento de lesões papulosas ou nodulares por toda a superfície corporal. Associada a *L. (L.) amazonensis*, é considerada a mais rara e severa manifestação clínica, cujas lesões podem persistir indefinidamente. O parasito é encontrado em grandes quantidades nas lesões e a resposta ao tratamento é insatisfatória, sendo este fato relacionado a uma resposta imune deficiente por parte do hospedeiro (BAILEY; LOCKWOOD, 2009). A LCD não deve ser confundida com a LC disseminada, pois esta última ocorre em indivíduos capazes de montar uma resposta imune celular contra *Leishmania* e apresenta boa resposta terapêutica (BRASIL, 2007).

A forma mucocutânea é a mais agressiva e mutilante da doença, apresentando lesões infiltrativas, com ulcerações e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe e laringe. Com baixa carga parasitária, oferece risco de deformidade permanente se não diagnosticada a tempo, uma vez que se desenvolve a partir das lesões cutâneas pré-existentes (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARSDEN, 1986; MARZOCHI, 1992).

1.3 Diagnóstico

Em virtude das diversas manifestações clínicas, o diagnóstico da LTA é realizado com dificuldades. É indispensável a diferenciação desta doença com outras de causas distintas, mas com espectro clínico similar (p. ex. hanseníase, câncer de pele, tuberculose, esporotricose) (REITHINGER et al., 2007). Além disso, ainda não existe uma técnica diagnóstica padrão-ouro para a LTA. Sendo assim, há a necessidade da associação de parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais com a finalidade de se obter um diagnóstico fidedigno.

No exame clínico, é interessante associar as informações coletadas através da anamnese do paciente a dados epidemiológicos. Dentre eles estão a existência de casos de LTA na região, referência de cães ou equinos com lesões residindo nas proximidades, procedência de área endemia e inserção de áreas florestais. Nas lesões cutâneas, os dados epidemiológicos referidos são recentes (em média 2 meses); no caso de lesão mucosa é essencial buscar também a história pregressa de ulceração de pele de longa duração, além da existência de cicatriz e utilização de medicamentos para leishmaniose (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000).

Dentre as técnicas laboratoriais utilizadas, a pesquisa direta é o procedimento de primeira escolha por ser rápido, de fácil execução e ter menor custo. O material a ser analisado pode ser obtido da escarificação da borda da lesão, impressão por aposição em lâmina (*imprint*) ou aspirado da lesão, corado pelo Giemsa ou Leishman. Embora a técnica seja específica, pois evidencia as formas amastigotas do parasito, é necessário um profissional treinado para realizá-la, além de apresentar sensibilidade inversamente proporcional à carga parasitária presente na lesão (BAILEY; LOCKWOOD, 2009; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O parasito cresce relativamente bem em meios de cultura enriquecidos, como NNN (McNeal, Novy & Nicole) acrescido de meio Schneider ou LIT (Liver infusion tryptose) com 10% de soro fetal bovino (SFB), à temperatura ambiente (BRASIL, 2007). Assim, a partir de punção aspirativa ou biópsia da lesão pode ser realizada a cultura para isolamento da *Leishmania*. Este método é importante para a confirmação do agente etiológico através da identificação da subespécie de *Leishmania* envolvida, por análise de zimodemas (isoenzimas) e por sequenciamento de DNA (BAILEY; LOCKWOOD, 2009).

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

Os testes sorológicos, como a imunofluorescência indireta (IFI), o *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e o Western Blot, são limitados por não relacionar os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença, além da possibilidade de apresentar reações cruzadas com outros tripanosomatídeos. Pelas limitações dessas técnicas, abordagens imunológicas alternativas vêm sendo empregadas. Uma delas é a citometria de fluxo que permite detectar anticorpos anti-*Leishmania* (ROCHA et al., 2002, 2006).

Técnicas de diagnóstico molecular baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido extensivamente desenvolvidas para a aplicação na LTA. Com alta sensibilidade e especificidade, são particularmente úteis em amostras contendo poucos parasitos, como na forma mucosa, além de permitir o monitoramento da terapia da leishmaniose cutânea. Contudo, o uso rotineiro é ainda impedido por demandar uma infra-estrutura laboratorial adequada, pessoal qualificado e alto custo (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

A utilização de métodos de diagnóstico laboratorial visa não somente a confirmação dos achados clínicos, mas pode fornecer importantes informações epidemiológicas, pela identificação da espécie circulante, orientando quanto às medidas a serem adotadas para o controle do agravo (BRASIL, 2007).

1.4 Tratamento

O tratamento é realizado através da quimioterapia com antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), cuja droga de primeira escolha utilizada no Brasil é o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), com alta toxicidade e efeitos colaterais diversos. A administração do medicamento é feita por via intramuscular ou endovenosa, com a dose variando de 10 a 20 mg Sb^{+5} /kg/dia, durante vinte ou trinta dias. O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não foi totalmente elucidado, embora alguns autores sugiram que a molécula pentavalente atue como uma pró-droga que, ao ser convertida em antimonial trivalente, passa a ser ativa e adquire maior toxicidade contra o parasito (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

No caso de não haver uma boa resposta ao tratamento com Glucantime® ou na impossibilidade de seu uso, a anfotericina B é uma das drogas de segunda escolha. Sua administração se dá por via endovenosa, gota a gota, na dose diária de 0,2 mg/Kg/dia até no máximo 50 mg. É dissolvida em soro glicosado 5% com tempo de infusão de 3 a 4 horas. Outra alternativa é a pentamidina, usada na dose de 4 mg/Kg/dia, por via intramuscular, sendo aplicado a cada dois dias (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

O critério de cura utilizado é o clínico, com a completa cicatrização da lesão e acompanhamento do paciente por até um ano após o término do tratamento (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Devido às dificuldades encontradas na execução do tratamento, como a via de administração da droga e presença de fortes efeitos colaterais, é de extrema importância salientar a necessidade de estudos com fármacos candidatos a novas drogas, na busca de tratamentos alternativos que proporcionem mais conforto aos pacientes e contribuam para novas estratégias de combate à LTA (TOLEDO et al., 2001).

Além disso, diante da complexidade apresentada pela interação parasito-vetor-hospedeiro, são relevantes estudos sobre mecanismos imunológicos induzidos em pacientes naturalmente infectados pela *Leishmania*, com o objetivo de desenvolver tratamentos à base de imunoterapia e também de vacinas (GOLLOB et al., 2008).

1.5 Resposta imunológica

Embora títulos de anticorpos sejam observados em todas as manifestações clínicas, a resolução da infecção é dependente de linfócitos T (CASTÉS et al., 1984, MENDONÇA et al., 1986). Além disso, ainda não está claro o papel da resposta imune humoral na infecção por *Leishmania* (SOUZA et al., 2005; TRUJILLO et al., 1999).

Sabe-se que, nas infecções por *Leishmania*, há o desenvolvimento de resposta imune predominantemente celular por parte do hospedeiro. Ocorre uma expansão caracterizada por células T CD4+, apresentando perfis de citocinas Th1 ou Th2 (PINHEIRO, 2004; REIS et al., 2006). No perfil Th1, citocinas como interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa e beta (TNF- α e - β) estão envolvidas na resistência e eliminação dos parasitos, enquanto citocinas do tipo Th2, como as interleucinas (IL) -4 e -10 estão ligadas à susceptibilidade a infecções por *Leishmania* (COUTINHO et al., 1996; VON STEBUT, 2007).

A infecção experimental em camundongos tem sido utilizada para examinar aspectos da relação parasito-hospedeiro na leishmaniose, como o controle genético de susceptibilidade e resistência, o papel da resposta imune mediada por células e a interação parasito-macrófago. Na LTA, o modelo mais estudado envolvendo a ativação de células T CD4+ foi a infecção em camundongos com promastigotas de *L. major* (HANDMAN; CEREDIG; MITCHELL, 1979; SCHARTON; SCOTT, 1993; SCOTT; FARRELL, 1998).

No perfil Th1 exibido por linhagens de camundongos resistentes (C57BL/6, CBA, C3H), ocorre uma doença auto-limitada em resposta à infecção com *L. major* ou *L. tropica*. Há um aumento nos níveis de IL-12, ativando células *natural killer* (NK) e células T CD4+ e CD8+ a produzirem IFN- γ (HOWARD; HALE; CHAN-LIEW, 1980; ROGERS et al., 2002). Esta atua em sinergia com TNF- α ativando a enzima óxido nítrico sintase (iNOS ou NOS-II) a produzir óxido nítrico (NO), resultando na morte intracelular do parasito (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000). Além disso, a IL-2, indutora de proliferação celular, está envolvida com o controle da atividade anti-*Leishmania* desempenhada por linfócitos T (BODAS et al., 2006).

Linhagens susceptíveis, como BALB/c, apresentam o perfil de resposta Th2 e, conseqüentemente, uma doença progressiva e severa, com um aumento na expressão de RNA mensageiro (mRNA) para IL-4 e na produção de IL-5, IL-10 e IL-13 (HIMMELRICH et al., 2000; HOWARD; HALE; CHAN-LIEW; 1980; SCOTT; FARREL, 1998). A IL-4 diminui a regulação da expressão da subunidade β dos receptores da IL-12 nas células Th1, suprimindo

a produção de IFN- γ , levando ao desenvolvimento da resposta Th2 (CARRERA et al., 1996; WANG et al., 1994). A IL-10 desempenha um papel fundamental na inibição da ativação macrofágica e contribui para o crescimento do parasito nas lesões, uma vez que camundongos BALB/c IL10^{-/-} mostraram-se capazes de controlar a progressão da doença durante infecção por *L. major* (KANE; MOSSER, 2001).

Em contraste, poucos trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de avaliar a resposta imune celular na infecção experimental por *L. (V.) braziliensis*. Isto acontece porque esta espécie não se desenvolve facilmente no ambiente *in vitro*, uma vez que sua transformação na forma infectante é ineficiente em condições padronizadas de cultura, sendo necessária uma grande carga parasitária para realizar a infecção (LIMA; DEKREY; TITUS, 1999).

Em 2005, Moura et al. demonstraram sucesso ao inocular *L. (V.) braziliensis* na orelha de camundongos BALB/c. O resultado clínico foi semelhante àquele observado no hospedeiro humano, especialmente em relação ao aspecto da lesão, à persistência do parasito e à resposta imune desenvolvida.

A dificuldade no estabelecimento de modelo experimental para *L. (V.) braziliensis* contribuiu para o desenvolvimento de estudos sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na LTA humana (BITTAR et al., 2007; CARVALHO et al., 1995; CASTELLANO et al., 2009; GOMES-SILVA et al., 2007; REIS et al., 2009). Em todas as formas clínicas da doença, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, aceita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção está associada ao nível de expansão de células Th1 e Th2. As diferentes manifestações clínicas são fortemente influenciadas pela resposta imune do hospedeiro (BACELLAR et al., 2002; PINHEIRO, 2004).

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

Durante a infecção, pacientes acometidos pela forma cutânea difusa falham em produzir uma resposta imune mediada por células. Devido a falta da expressão de mRNA para IFN- γ e baixa expressão para IL-2, são incapazes de controlar a multiplicação parasitária e a progressão da doença. Além disso, altos títulos de anticorpos específicos contra *Leishmania* são exibidos, bem como uma resposta quase exclusivamente do tipo Th2, com elevados níveis de IL-4 (BONFIM et al., 1996; CÁCERES-DITTMAR et al., 1993; TRUJILLO et al., 1999).

A forma muco-cutânea exibe um aumento de resposta por células T específicas, tanto Th1 como Th2, sendo predominante o perfil Th1. Assim, são produzidos altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ , além de IL-4. Com a fraca regulação dessa resposta por IL-10 e pelo fator de crescimento e transformação-beta (TGF- β) e consequente exacerbação do perfil Th1, pode-se perceber que uma resposta inadequada pode levar a uma imunopatogênese exacerbada. Além disso, são encontrados altos títulos de anticorpos (AMATO et al., 2003; BACELLAR et al., 2002; JUNQUEIRA PEDRAS et al., 2003).

Além dos perfis Th1 e Th2, a resposta imune nas infecções por *Leishmania* tem sido cada vez mais aprofundada em termos de complexidade. Em alguns trabalhos, foi descrito o perfil Th3, induzido por TGF- β , que pode induzir e manter a tolerância periférica através de células T regulatórias (T_{reg}) (WEINER, 2001; CARRIER et al., 2007), além do perfil Th17, que pode estar envolvido em processos que levam à cronicidade da doença (BACELLAR et al., 2007; BETTELLI et al., 2008).

A manifestação da doença requer mecanismos que permitam replicação de parasito no hospedeiro e sua resistência, pelo menos inicialmente, às defesas imunes. Assim, em paralelo à existência de uma resposta imunológica por parte do hospedeiro, a sobrevivência e a persistência parasitária dependem de estratégias de escape da resposta imune inata e adaptativa (REIS et al., 2006).

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

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

Portanto, para o estabelecimento da infecção, a *Leishmania* precisa sobreviver ao processo de fagocitose que envolve a invasão em células-alvo seguras, a inibição da formação do fagolisossomo e a remoção dos radicais hidroxilas e ânions superóxidos através do LPG. Além disso, a inibição da degradação das enzimas do fagolisossomo pela gp63, a transformação em amastigotas, mais resistentes a óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a resistência ao pH ácido do fagolisossomo são também mecanismos de escape. A *Leishmania* utiliza outros mecanismos que auxiliam nas estratégias de escape da defesa do hospedeiro. A modulação de citocinas pode ocorrer através da inibição/desativação de macrófagos, pela supressão ou perda da indução da ativação de citocinas; a inibição da apresentação de antígeno e da estimulação de células T, pela supressão, internalização e degradação de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) tipo II e a alteração da função/diferenciação de células T através da indução e expansão de células do tipo Th2 são algumas das estratégias de escape do parasito à resposta do hospedeiro (BOGDAN et al., 1996; BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; ROGERS et al., 2002).

Esses mecanismos imunológicos promovem a persistência do parasito após a cura clínica da doença. A demonstração da persistência em indivíduos curados clinicamente levanta várias questões a respeito da evolução clínica, da epidemiologia e das estratégias para o controle da leishmaniose (AEBISCHER, 1994; MENDONÇA et al., 2004). Além disso, tem incentivado grupos de pesquisa a estudarem os mecanismos imunológicos envolvidos na evolução clínica de pacientes infectados por *Leishmania* através de técnicas de cultura celular e posterior dosagem de citocinas, tanto em indivíduos submetidos a tratamento quanto em pacientes curados espontaneamente (CARVALHO et al., 1995; BITTAR et al., 2007; GOMES-SILVA et al., 2007; REIS et al., 2009). Diversos antígenos protéicos são utilizados com a finalidade de induzir uma resposta imune benéfica, podendo ser considerados candidatos potenciais ao desenvolvimento de tratamentos baseados em imunoterapia e de vacinas.

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

A proteína P-4 purificada de amastigotas de *Leishmania pifanoi* demonstrou uma resposta celular do tipo Th1 em PBMC de indivíduos infectados por *L. (V.) braziliensis* (HABERER et al., 1998). Em estudos com camundongos, o antígeno PH8, derivado de promastigotas de *L. amazonensis*, levou à produção de níveis elevados de IFN- γ e ausência de IL-4 (MAYRINK et al., 2002).

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

Toledo et al. (2001) e Da-Cruz et al. (2002) avaliaram a imunidade celular de pacientes com LTA utilizando o antígeno total de *L. (V.) braziliensis*, antes e após o tratamento quimioterápico. Os autores demonstraram que a existência de possíveis parâmetros na resposta imune associados à cura após o tratamento sugere que há um importante componente imunológico na resposta à quimioterapia. Particularmente relevante é o estudo da imunidade celular de pacientes que obtiveram cura clínica sem a necessidade de tratamento (espontânea), o que sugere o desenvolvimento de resposta imune protetora (CARVALHO et al., 1995).

Em 2007, Gomes-Silva et al. observaram que, frente ao antígeno total de *L. (V.) braziliensis*, pacientes curados espontaneamente exibiram níveis de IFN- γ menores que aqueles de pacientes com lesão ativa. Em contraste, uma produção significativa de IL-10 contra o mesmo antígeno foi detectada nos pacientes com cura espontânea em relação ao grupo de pacientes com LTA ativa. Segundo os autores, este resultado pode ser explicado por uma possível habilidade inerente aos pacientes com bom prognóstico da doença em produzir níveis ótimos dessas citocinas com efeitos benéficos no hospedeiro, embora os mecanismos que levam a um equilíbrio adequado entre mediadores pró-inflamatórios e suas moléculas reguladoras ainda não estejam totalmente esclarecidos.

Paralelamente a esse estudo surgiu, por parte de nosso grupo de pesquisa, a proposta de caracterizar a resposta imune frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. Verificou-se diminuição da reatividade anticórpica frente ao antígeno solúvel ao comparar soros de pacientes obtidos antes e após o tratamento quimioterápico, sendo observado resultado semelhante em pacientes com cura espontânea. Nesses pacientes também foi observada resposta imune humoral aumentada frente ao antígeno insolúvel (BRITO et al., 2000; 2001).

Mais recentemente, nosso grupo avaliou a resposta imune celular de pacientes com LTA ativa antes e após tratamento quimioterápico, frente ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (REIS et al., 2009). Este trabalho concluiu que há resposta proliferativa e produção de IL-10 e IFN- γ específicas antes e após tratamento quimioterápico frente a esse antígeno, sugerindo que mecanismos de regulação imunológica com a participação de células

T de memória e células T regulatórias, além da dicotomia Th1 x Th2 estão presentes na evolução clínica desses indivíduos.

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar americana representa um grave problema de saúde pública em Pernambuco. Sua importância reside não só na incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem repercutir no campo psicossocial do indivíduo. Considerando que a resposta imune celular é fundamental para a determinação da cura ou progressão da doença, este estudo foi realizado com a finalidade de verificar uma possível associação entre o padrão de citocinas e de óxido nítrico produzidos por células T específicas ao parasito e o curso da infecção de pacientes com lesão ativa e de indivíduos curados espontaneamente.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Qual o perfil da resposta imune celular de pacientes com leishmaniose tegumentar americana ativa e após cura clínica, utilizando-se os antígenos solúvel e insolúvel de *Leishmania (Viannia) braziliensis*?

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Determinar o perfil da resposta imune celular em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em pacientes portadores de leishmaniose tegumentar ativa e após cura clínica frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*.

4.2 Específicos

- a) Determinar o tempo de cultivo para os ensaios de sobrenadante de cultura para dosagem de citocinas;
- b) Identificar a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10 nos sobrenadantes de cultura de PBMC após estímulo *in vitro* com os antígenos solúvel e insolúvel de *L.(V.) braziliensis*;
- c) Verificar a produção de NO nos sobrenadantes de cultura de PBMC após estímulo *in vitro* com os antígenos solúvel e insolúvel de *L.(V.) braziliensis*;
- d) Associar a produção das citocinas e de NO com a evolução clínica dos pacientes, especificamente com tamanho da lesão para os pacientes com lesão ativa e com o resultado da IDR para os indivíduos curados espontaneamente;
- e) Comparar a produção de citocinas e de NO em resposta aos antígenos solúvel e insolúvel entre os pacientes avaliados.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 Tipo de Estudo

O estudo foi do tipo experimental (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. Ambos foram escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

5.2 Descrição da população estudada

Os pacientes do presente estudo foram procedentes de Amaraji, Chã de Alegria, Vicência (Região de Mata Pernambucana), Moreno e Araçoiaba (Região Metropolitana de Recife). Foram selecionados pacientes com LTA ativa ($n = 14$) e pacientes com cura clínica espontânea (CE, $n = 11$), de ambos os sexos e idade superior a quinze anos. Para a seleção de pacientes com LTA ativa, foram observados os seguintes critérios: apresentação de uma ou mais lesões cutâneas ativas, diagnóstico confirmado para LTA pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do CPqAM (SRL) e ausência de tratamento quimioterápico prévio. Aqueles menores de quinze anos, com história pregressa de LTA ou que se submeteram à quimioterapia foram excluídos deste grupo.

O histórico de doença pregressa, apresentação de cicatriz característica da lesão (aspecto de pergaminho), IDRMs 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 Intradermoreação de Montenegro (IDRM) e tratamento quimioterápico prévio.

Os pacientes foram atendidos no ambulatório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, onde realizaram-se os exames clínico-laboratoriais e os procedimentos de coleta de sangue. No grupo de pacientes com LTA ativa, o sangue foi coletado antes da quimioterapia (AT) e um ano após o seu término (PT). Já no grupo dos pacientes curados

espontaneamente, a coleta aconteceu apenas em um momento. O critério de cura clínica para os pacientes tratados foi estabelecido considerando-se a completa cicatrização da lesão e a resposta terapêutica. No período de um ano após o final do tratamento, foi realizado o acompanhamento do processo de cicatrização, além da verificação da ocorrência de efeitos colaterais decorrentes do tratamento.

O tratamento quimioterápico foi realizado nos postos de saúde dos municípios deste estudo, utilizando-se o Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina), droga de primeira escolha, administrado via intramuscular. O tratamento foi feito em 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 grupo controle (n = 9) constituiu-se de voluntários saudáveis, com idade acima de quinze anos, residentes em área não endêmica e sem história prévia de transfusão sanguínea. O material coletado foi processado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, na cidade de Recife-PE.

5.3 Considerações éticas

Os procedimentos para coleta de sangue foram realizados somente após o indivíduo concordar em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (apêndices A, B e C). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Instituição (CEP/CPqAM n° 123/08, CAAE n° 0122.0.095.000-08, Anexo A).

5.4 Obtenção dos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*

Formas promastigotas (cepa MHOM/BR/75/M2903) foram expandidas em cultura com meio Schneider's (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 mg/ml – Cultilab) 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, as alíquotas estocadas foram descongeladas, ressuspensas em água destilada contendo inibidores de proteases (metil-fenil-fluoreto – PMSF, 0,01mM e ácido etilenodiaminotetracético – EDTA, 2 mM) e pepstatina A, 0,001 M. Em seguida, foram ultrassonicadas e centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante removido foi submetido a uma nova centrifugação a 100.000 x g durante uma hora, à mesma temperatura. O sobrenadante resultante correspondente ao antígeno solúvel e o sedimento, antígeno insolúvel de *L. (V.) braziliensis*, 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, os antígenos foram armazenados a –20°C até a utilização nos ensaios de cultura celular (REIS et al., 2009).

5.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico

Quarenta mililitros de sangue foram coletados utilizando-se o sistema a vácuo (Vacutainer). O sangue foi diluído em PBS pH 7,2 na proporção 2:1 e transferido para tubos cônicos (BD) contendo Ficoll-Paque (Amersham Biosciences), também na proporção 2:1. Após centrifugação a 800 x g por 30 minutos a 20°C, a camada de PBMC obtida entre a mistura de Ficoll-Paque e o plasma foi removida e depositada em novos tubos cônicos. Depois de nova centrifugação a 300 x g por 30 minutos a 20°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado 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 ressuspensado em meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Sigma) suplementado com 10% de SFB. Uma alíquota da suspensão celular foi então removida, diluída 1:20 em azul de trypan (Sigma) e quantificada em câmara de Neubauer.

5.6 Obtenção de sobrenadantes de cultura

Suspensões celulares foram cultivadas em placas de 24 poços (TPP), na concentração de 10^6 células/poço. O cultivo foi realizado em meio RPMI 1640 contendo 1% de L-glutamina 200 mM, 1% piruvato de sódio 100 mM, 0,2% de bicarbonato de sódio 7,5% e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 mg/ml) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab). As PBMC foram estimuladas com os antígenos solúvel (1,25 μ g/ml) e insolúvel (2,5 μ g/ml) de *L. (V.) braziliensis*. Como controle positivo do ensaio, os mitógenos concanavalina A (Sigma) e fitohemaglutinina (Cultilab) foram utilizados nas concentrações de 2,5 μ g/ml e 5 μ g/ml, respectivamente. Células mantidas apenas com meio de cultura foram os controles negativos do ensaio. As placas foram mantidas em estufa à 37°C/5% de CO₂ durante 24, 48, 72 horas ou 6 dias. Após o tempo de incubação, as placas passaram por centrifugação (1800 x g por 10 min, a T.A.) e os sobrenadantes de cultura foram coletados e estocados a -80°C para posterior utilização

5.7 Dosagem das citocinas secretadas nos sobrenadantes de cultura

A dosagem das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10 foi realizada através do ELISA de captura, utilizando-se o Kit OptEIA, (BD Biosciences), seguindo orientações do fabricante. Placas de ELISA (Costar half-area plate-96 poços) foram sensibilizadas com 25 μ l dos anticorpos anti-citocinas específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e incubadas por 18h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com 150 μ l/poço de PBS pH 7,2-Tween-20 0,05% (PBS-Tw), e incubadas com 100 μ l de solução bloqueadora contendo soro fetal bovino (PBS pH 7,2 + 10% SFB) por 1h, a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tw.

Os padrões das citocinas foram diluídos seriadamente (fator 2) em PBS pH 7,2 + 10% SFB a partir da concentração inicial recomendada pelo fabricante. Em seguida, 25 μ l da amostra e dos padrões foram adicionados em duplicata e a placa incubada por 2h a TA. Quando necessário, as amostras eram diluídas em PBS pH 7,2 + 10% SFB. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-Tw e 25 μ l dos anticorpos biotinizados

específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em PBS pH 7,2 + 10% SFB foram adicionados por 1h30min, a TA. Após nove lavagens com PBS-Tw, foram adicionados 50µl da solução reveladora contendo ABTS - 2,2-azino-de [sulfato(6)de 3-etil benzitiazolina] (KPL). A reação foi bloqueada com 25µl de ácido sulfúrico 1 M e a leitura realizada no espectrofotômetro (Bio-Rad 3550) a 415 nm. As concentrações das amostras foram calculadas na região linear da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/ml, utilizando o software Microplate Manager, versão 4.0 (Bio-Rad laboratories).

5.8 Dosagem de óxido nítrico

Para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess, que consiste na detecção de nitrito (NO_2^-), resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura previamente coletados. Adicionou-se à uma placa de ELISA de 96 poços (Costar half-area plate) 25µl do sobrenadante de cultura em duplicata (diluído em RPMI suplementado com SFB 2%, quando necessário), seguido do mesmo volume do reagente de Griess. Este é composto de sulfanilamida 1% diluída em H_3PO_4 2,5% (solução A) e de N-1-naphtyl-ethylenodiamina, também diluído em solução de H_3PO_4 a 2,5% (solução B). Para a confecção de uma curva-padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200µM passou por diluições seriadas (fator 2) em RPMI suplementado com 2% de SFB. Após incubação de 10 minutos ao abrigo da luz, a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 450 nm. A absorbância das diferentes amostras foram comparadas com a curva-padrão, e os resultados obtidos expressos como a média da duplicata \pm erro padrão, utilizando-se o software Microplate Manager 4.0 (BioRad).

5.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no Laboratório de Métodos Quantitativos do Núcleo de Saúde Coletiva do CPqAM, empregando-se testes não paramétricos. A análise para medir a variabilidade intra-grupo foi realizada pelo teste dos postos sinalizados de Wilcoxon. Já entre

os grupos o teste U de Mann-Whitney foi utilizado. Para a correlação de variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de postos de Spearman. Todas as conclusões foram tomadas no nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2007, o Graphpad Prism 5.0 e o SPSS 8.0.

6 RESULTADOS

6.1 Características da população estudada

6.1.1 Pacientes com LTA ativa

Os pacientes com LTA ativa foram avaliados de acordo com critérios como idade, sexo e localidade de origem, forma clínica, número de lesões, localização das lesões e tempo de evolução da doença. Um ano após o término do tratamento quimioterápico, os mesmos passaram por nova avaliação clínica, com o objetivo de verificar a cicatrização da lesão e notificar a quantidade de ampolas administradas por paciente. A Tabela 1 descreve os dados dos pacientes de acordo com os critérios acima citados.

Foram selecionados quatorze pacientes com lesão ativa obedecendo-se os critérios de inclusão e exclusão, com o grupo sendo dividido igualmente em número de pacientes de ambos os sexos. A faixa etária apresentou média de 41 anos e variou de 20 a 57 anos. Os pacientes foram provenientes dos municípios de Amaraji (n = 2), Chá de Alegria (n = 1), Araçoiaba (n = 1), e Moreno (n = 10), localizados a 96 km, 52 km, 49 km e 28 km da cidade do Recife. As duas primeiras localidades são consideradas Região de Mata Pernambucana, enquanto que as duas últimas fazem parte da Região Metropolitana do Recife (IBGE, 2008).

Todos os pacientes tiveram diagnóstico laboratorial confirmado para LTA pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do CPqAM. Eles apresentaram lesões cutâneas ulceradas com bordas elevadas e fundo granulomatoso, com área total variável entre 0,25 mm² a 39 mm² (média de 27 mm² ± 9), distribuídas em sua maioria por áreas descobertas do corpo. A maioria dos pacientes apresentou apenas uma lesão (64,3%), enquanto 28,6% apresentaram duas lesões. Apenas um paciente apresentou oito lesões ativas distribuídas pela superfície corporal (7,1%), sendo uma lesão maior e sete de tamanhos similares. O tempo de evolução da doença, contado desde o surgimento da lesão até a procura do paciente pelo núcleo de vigilância em saúde dos municípios, variou de oito dias a três meses (Tabela 1).

Tabela 1. Dados demográficos, clínicos e terapêuticos dos pacientes com LTA ativa.

Paciente	Idade	Sexo	Localidade	Forma clínica	Nº lesões	Evolução	Local das lesões	Tamanho das lesões (mm ²)	Ciclos
01	53	F	Amaraji	CL	01	03 meses	Perna D	12,25	NI
02	47	M	Amaraji	CL	01	03 meses	Perna E	21	NI
03	21	F	Moreno	CL	01	02 meses	Tronco	32	02
04*	25	M	Moreno	CL	08	01 mês	Pernas E e D/ Mão E	2/ 24,5	04
05	41	F	Moreno	CL	02	08 dias	Perna D	0,25/ 5	02
06	39	M	Moreno	CL	01	01 mês	Perna E	36	02
07	33	F	Moreno	CL	02	01 mês	Perna D	24/ 27,5	02
08	52	M	Moreno	CL	02	02 meses	Tronco/ Ombro	24,75/ 15	01
09	58	F	Moreno	CL	01	01 mês	Perna D	18	01
10	20	M	Chã de Alegria	CL	02	02 meses	Perna D	8/ 7,5	02
11	56	M	Araçoiaba	CL	01	03 meses	Perna D	39	03
12	28	F	Moreno	CL	01	15 dias	Pé D	NI	02
13	26	F	Moreno	CL	01	02 meses	Perna D	36	02
14	34	M	Moreno	CL	01	03 meses	Perna E	6	02

Nota: NI = não informado; F = feminino; M = masculino; CL = cutânea localizada; D = direita; E = esquerda. * Paciente com uma lesão medindo 24,5 mm², e sete lesões medindo em média 2mm².

Após o tratamento com Glucantime®, realizado como descrito anteriormente na metodologia, foi realizado o acompanhamento dos pacientes por um ano. Após este período, todos os pacientes exibiram completa cicatrização das lesões. Em dois pacientes foi administrado apenas um ciclo do antimonial (14%), enquanto que duas séries de Glucantime® foram realizadas em 57% dos pacientes. Nos pacientes restantes, foram aplicados de três a quatro ciclos.

6.1.2 Pacientes curados espontaneamente

Para os indivíduos curados espontaneamente, além de idade, sexo e localidade, foram utilizados como parâmetros de avaliação o número de cicatrizes, localização das mesmas e tempo de cicatrização. Além disso, foi também utilizado o resultado da IDRM, considerada positiva quando igual ou maior que 5 mm. Os dados referentes a estes critérios estão descritos na Tabela 2.

Foram selecionados onze pacientes de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, sendo 40% do grupo composto de pacientes do sexo masculino e 60% de pacientes do sexo feminino. O grupo apresentou média de idade de 50,7 anos, com variação de 17 a 81 anos. Os indivíduos eram naturais de Moreno (n = 6), Amaraji (n = 1) e Vicência (n = 4). Este último município é considerado Região de Mata Pernambucana e está localizado a 83 km do Recife (IBGE, 2008).

Todos os indivíduos deste grupo apresentaram, no momento da avaliação clínica, cicatrizes com aspecto de pergaminho, características de LTA pregressa, sobre a superfície corporal. A maioria apresentou apenas uma cicatriz. Apenas um paciente apresentou quatro cicatrizes. Os pacientes 03 e 11 foram examinados tanto no período em que a lesão estava ativa quanto após a cura clínica espontânea. O tempo de cicatrização, contado desde o aparecimento da lesão até a formação da cicatriz, variou de quinze dias a nove meses.

Todos os pacientes exibiram IDRM acima de 5 mm, sendo positiva para LTA. Os valores variaram entre 5 e 15 mm.

Tabela 2. Dados demográficos e clínicos dos pacientes curados espontaneamente.

Paciente	Idade	Sexo	Localidade	Nº cicatrizes	Localização das cicatrizes	Tempo de cicatrização	IDRM (mm)
01	77	M	Moreno	01	Perna E	3 meses	12
02	71	M	Moreno	01	Antebraço E	NI	10
03	81	M	Moreno	01	Perna D	15 dias	10
04	28	M	Moreno	01	Coxa E	3 meses	12
05	NI	F	Amaraji	01	Pé E	1 mês	05
06	47	F	Vicência	04	Pescoço, Ombro E, Coxa D, Perna E	9 meses	12
07	17	F	Vicência	01	Perna E	NI	08
08	30	M	Vicência	01	Pé D	4 meses	10
09	39	F	Vicência	01	Perna D	8 meses	07
10	60	F	Moreno	01	Tornozelo E	3 meses	10
11	57	F	Moreno	01	Perna E	2 meses	15

Nota: NI = não informado; M = masculino; F = feminino; D = direito(a); E = esquerdo(a); IDRM = Intradermorreação de Montenegro.

6.2 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 5) quando comparadas ao peso molecular padrão (Sigma).

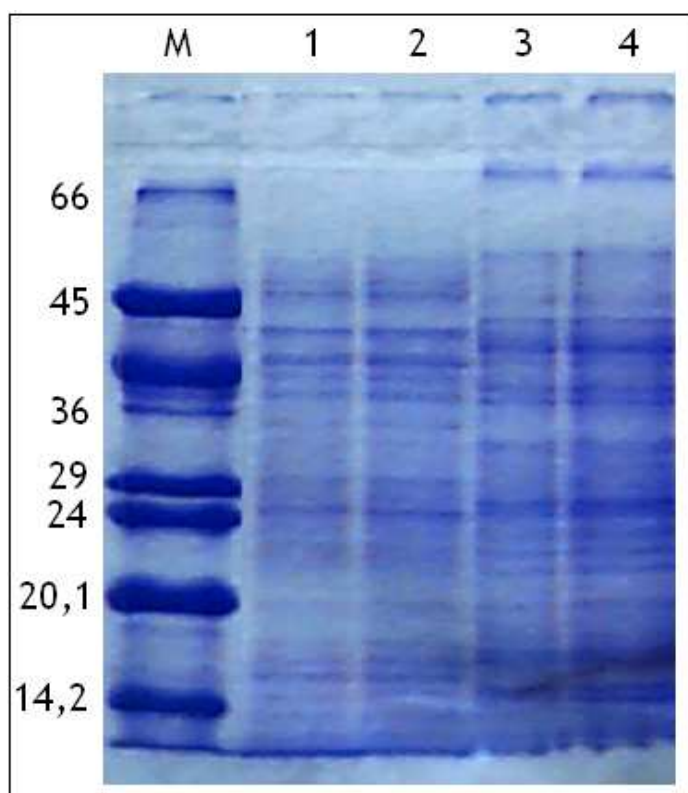


Figura 5: SDS-PAGE de proteínas solúveis (1 e 2) e insolúveis (3 e 4) de *L. (V.) braziliensis*.

Nota: 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).

6.3 Dosagem de citocinas secretadas em sobrenadantes de cultura

6.3.1 Padronização do ensaio de sobrenadante de cultura

Com a finalidade de estabelecer o tempo de cultivo para as dosagens de IFN- γ , IL-10, TNF- α e IL-2, um ensaio de padronização foi previamente realizado. PBMC de cinco pacientes com lesão ativa e de cinco indivíduos do grupo controle foram incubadas por 24 horas, 48 horas, 72 horas e 6 dias na presença dos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*, nas concentrações de 1,25 $\mu\text{g/ml}$ e 2,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Em seguida, o ELISA de captura foi realizado com os sobrenadantes, a fim de determinar o tempo de cultivo que apresentou as maiores médias de densidades ópticas (DOs) em PBMCs de pacientes. Os resultados para cada citocina são descritos nos tópicos a seguir.

6.3.1.1 Interferon-gama

Para esta citocina, a padronização foi realizada utilizando-se apenas o antígeno insolúvel. Para o antígeno solúvel foi utilizada como referência a padronização realizada em trabalhos anteriores do nosso grupo (REIS et al., 2009), a partir da qual pudemos optar pelo tempo de 6 dias.

A Figura 6 mostra que, em todos os tempos, o antígeno insolúvel induziu maior produção de IFN- γ no grupo de pacientes em relação ao grupo controle, com diferença significativa no tempo de 6 dias ($P = 0,038$). Assim, este tempo foi escolhido para os próximos ensaios utilizando-se ambos os antígenos.

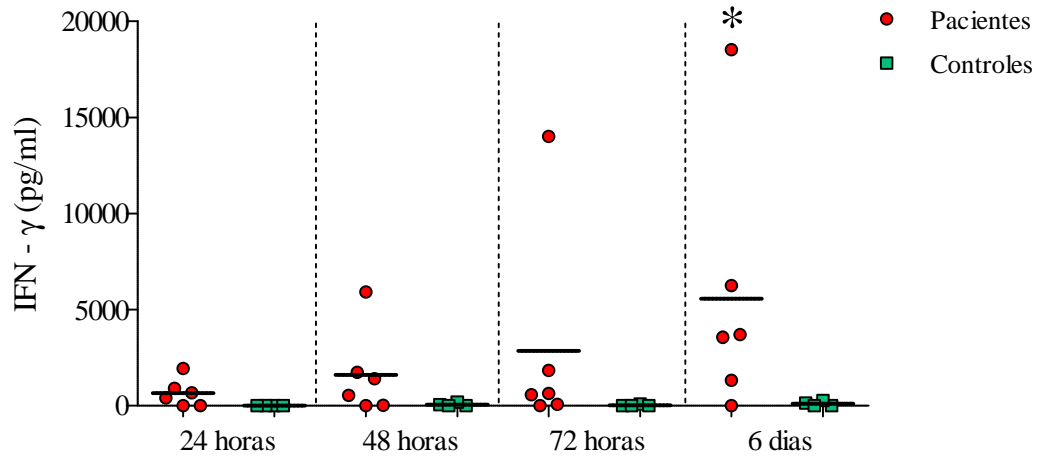


Figura 6: Padronização da produção de IFN- γ por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno insolúvel de *L. (V.) braziliensis*.

Nota: em cada tempo, o asterisco mostra a diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). As barras horizontais representam as médias dos grupos.

6.3.1.2 Fator de necrose tumoral-alfa

Como mostra a Figura 7, em todos os tempos analisados houve maior produção de TNF- α por PBMC de pacientes em resposta ao antígeno solúvel, embora sem diferença estatística significativa em relação aos controles ($P > 0,05$).

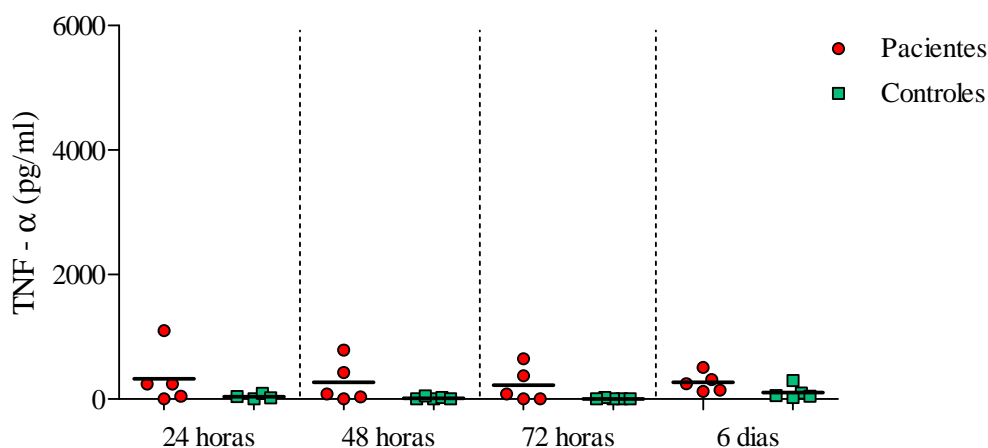


Figura 7: Padronização da produção de TNF- α por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* ($P > 0,05$).

Nota: as barras horizontais representam as médias dos grupos.

Em relação ao antígeno insolúvel (Figura 8), a produção da citocina foi estatisticamente significativa nos pacientes ($P = 0,031$) em relação ao grupo controle no tempo de 48 horas. Assim, optou-se por este tempo de cultivo para ambos os antígenos.

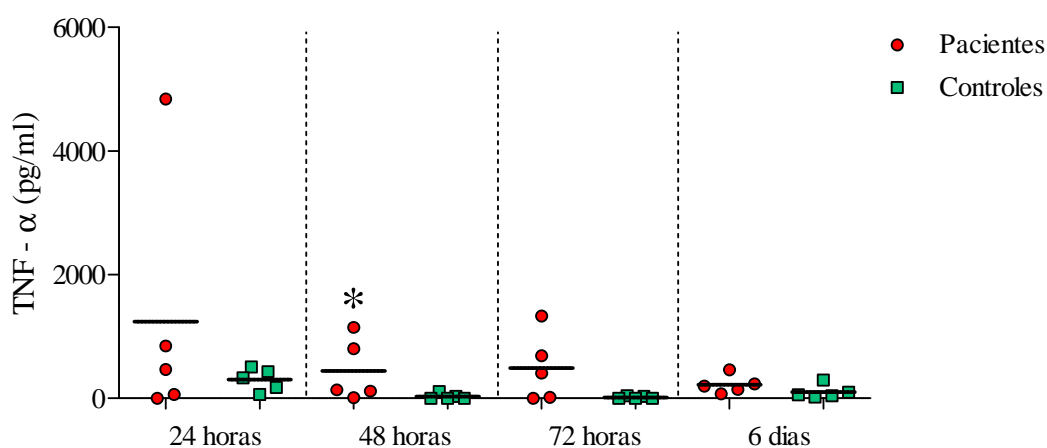


Figura 8: Padronização da produção de TNF- α por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno insolúvel de *L. (V.) braziliensis*.

Nota: em cada tempo, o asterisco mostra a diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). As barras horizontais representam as médias dos grupos.

6.3.1.3 Interleucina-2

A figura 9 mostra a produção de IL-2 frente ao antígeno solúvel nos diferentes tempos. Embora nos tempos de 48 horas e 6 dias tenha se observado maior produção dessa citocina por PBMC de pacientes, comparando-se aos controles, não houve diferença significativa entre os tempos de cultivo ($P > 0,05$).

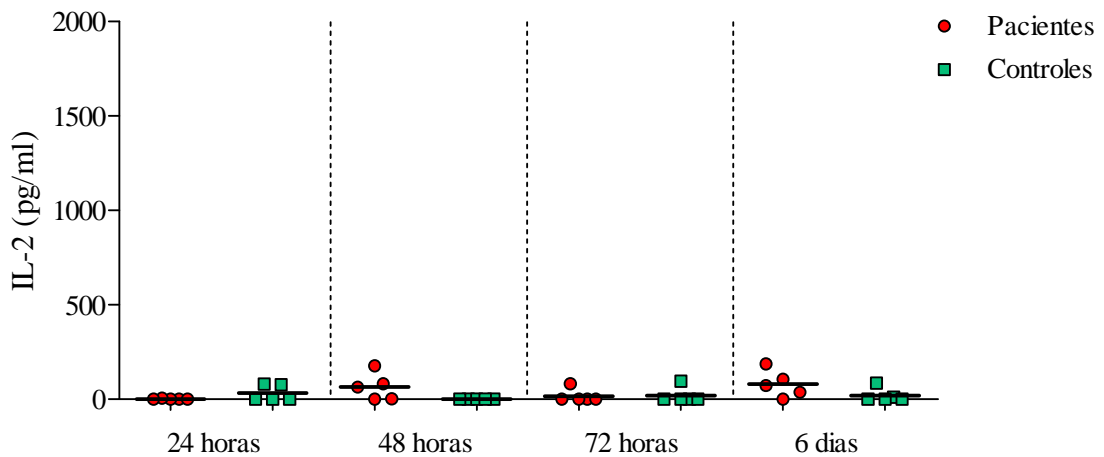


Figura 9: Padronização da produção de IL-2 por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* ($P > 0,05$).

Nota: as barras horizontais representam as médias dos grupos.

Em relação ao antígeno insolúvel, também não foi observada diferença significativa entre pacientes e grupo controle ($P > 0,05$) em nenhum dos tempos avaliados (Figura 10). Assim, foi escolhido o tempo de 72h para a dosagem de IL-2 utilizando-se ambos os antígenos.

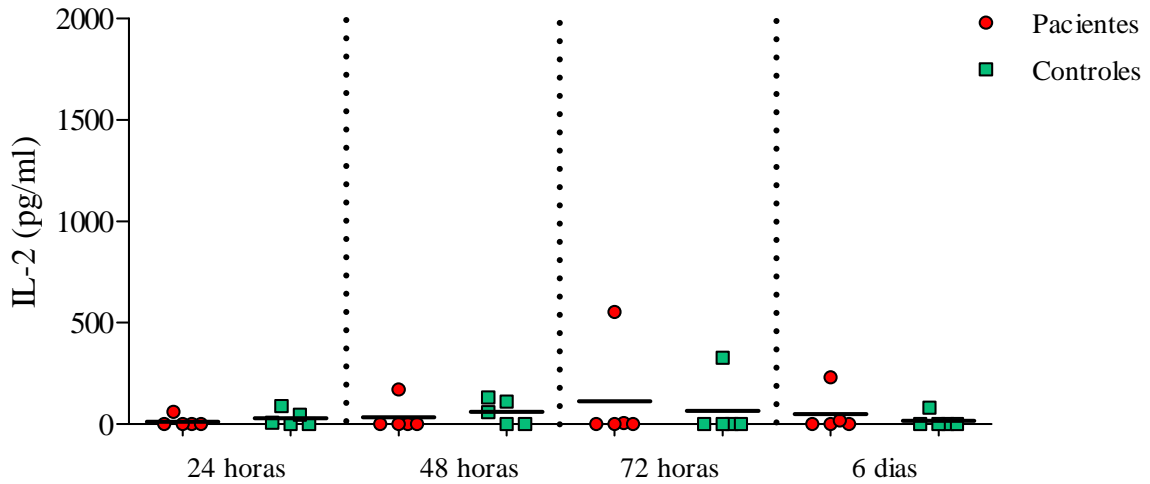


Figura 10: Padronização da produção de IL-2 por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno insolúvel de *L. (V.) braziliensis* ($P > 0,05$).

Nota: as barras horizontais representam as médias dos grupos.

6.3.1.4 Interleucina-10

Em relação ao antígeno solúvel, os pacientes apresentaram maiores níveis de IL-10 quando comparadas ao controle em todos os tempos, com diferença estatística significativa entre os grupos ($P = 0,008$) em 6 dias de cultivo (Figura 11).

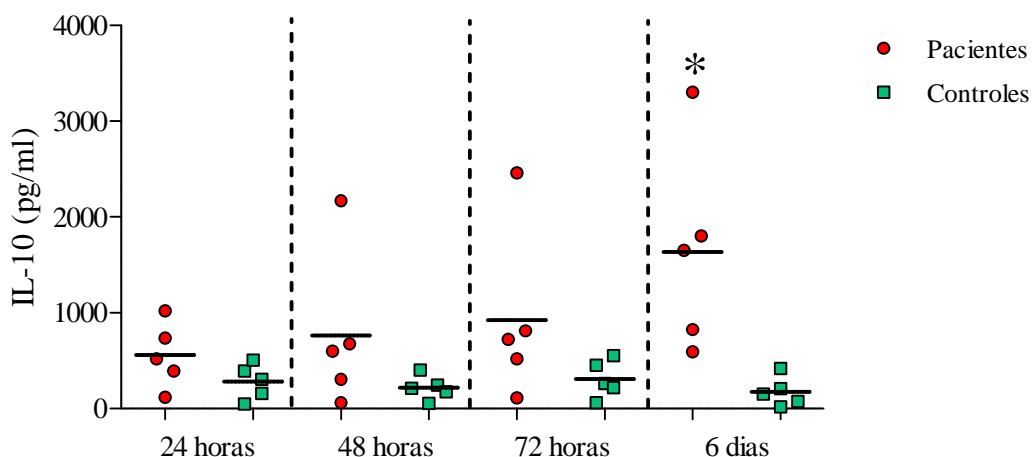


Figura 11: Padronização da produção de IL-10 por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*.

Nota: em cada tempo, o asterisco mostra a diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). As barras horizontais representam as médias dos grupos.

Similarmente, uma maior concentração de IL-10 foi verificada nos pacientes em relação ao grupo controle na presença do antígeno insolúvel, embora sem apresentar diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos nos tempos estudados (Figura 12). Assim, para ambos os antígenos, foi possível optar pelo tempo de 6 dias para realização das dosagens de IL-10.

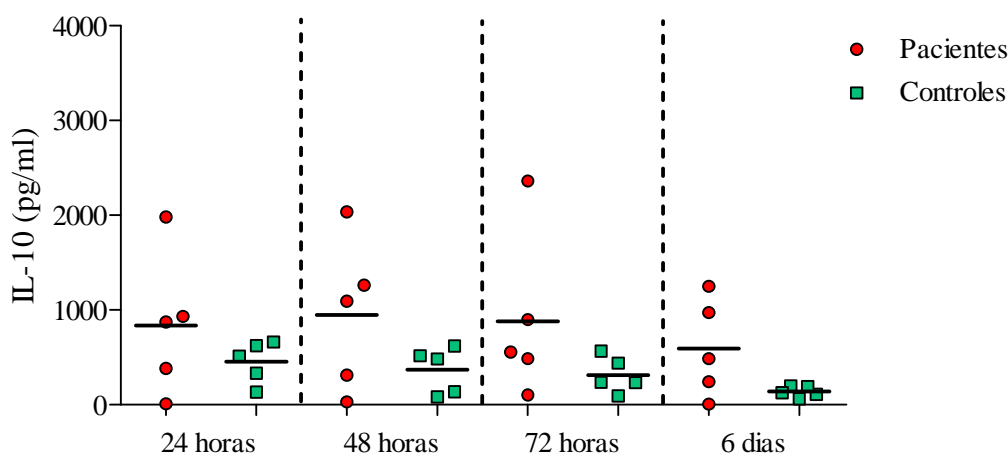


Figura 12: Padronização da produção de IL-10 por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle estimuladas com o antígeno insolúvel de *L. (V.) braziliensis* ($P > 0,05$).

Nota: as barras horizontais representam as médias dos grupos.

6.3.2 Produção de citocinas na LTA ativa e após cura clínica

A determinação dos níveis de cada citocina foi realizada após estimulação das PBMC com ConA (2,5µg/ml), PHA (5,0µg/ml) e antígenos solúvel (1,25µg/ml) e insolúvel (2,5µg/ml) de *L. (V.) braziliensis*. Além disso, também foi avaliada a produção da citocina em culturas não estimuladas. O tempo de incubação para IFN- γ , IL-10 foi de 6 dias, enquanto que para TNF- α e IL-2 o tempo de cultivo foi de 48h e 72h, respectivamente. Para os pacientes com lesão ativa a análise foi realizada antes e após um ano do término do tratamento quimioterápico.

6.3.2.1 Interferon-gama

Como mostra a Figura 13, em resposta à ConA, PBMC de pacientes com lesão ativa produziram níveis significativos de IFN- γ quando comparados ao grupo controle ($P = 0,014$). Resultado semelhante foi observado ao comparar este grupo aos pacientes pós-tratamento ($P = 0,0062$). Em contraste, não foi encontrada diferença estatística ao comparar os pacientes antes e depois da quimioterapia ($P > 0,05$). Os pacientes de cura espontânea produziram a citocina em maior concentração quando comparados ao grupo controle, embora sem diferença estatística ($P > 0,05$). Esses mesmos pacientes produziram níveis de IFN- γ similares aos apresentados pelos pacientes com lesão ativa.

Os três grupos de pacientes produziram IFN- γ sob estímulo com PHA. Todos os grupos de pacientes apresentaram maior produção de IFN- γ em relação aos indivíduos saudáveis, embora sem diferença significativa ($P > 0,05$). Os pacientes tratados apresentaram maiores níveis da citocina em relação aos pacientes antes do tratamento e aos curados espontaneamente, embora sem diferença significativa em ambas as comparações (Figura 13).

A Figura 13 também mostra os níveis de IFN- γ frente aos antígenos. Foi demonstrada produção significativa de IFN- γ nos pacientes antes da quimioterapia ($P = 0,0061$) e nos curados espontaneamente ($P = 0,0127$) frente ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*, quando comparados ao grupo controle. Embora os pacientes após a quimioterapia tenham apresentado maiores níveis da citocina em relação aos indivíduos saudáveis, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$). Resultado similar foi constatado ao comparar

ao pacientes antes e após o tratamento ainda que, no segundo momento, a média da produção de IFN- γ tenha apresentado tendência ao declínio. Também não houve diferença estatística entre os níveis de citocina produzidos entre os indivíduos com cura espontânea e os pacientes antes e após o tratamento ($P > 0,05$).

Em resposta ao antígeno insolúvel, PBMC dos pacientes com lesão ativa ($P = 0,0034$), tratados ($P = 0,0134$) e curados espontaneamente ($P = 0,0017$) apresentaram níveis estatisticamente maiores de IFN- γ em comparação aos controles. Em contrapartida, não foi observada diferença estatística ao comparar os pacientes antes e após o tratamento ($P > 0,05$), embora no segundo momento a média da produção da citocina tenha aumentado. Também não foi significativa a comparação entre os pacientes com cura espontânea e os pacientes antes e após a quimioterapia ($P > 0,05$).

Ao comparar as médias da produção de IFN- γ em resposta aos antígenos nos grupos de pacientes, pode-se observar que o antígeno insolúvel promoveu maiores níveis da citocina, com diferença estatística significativa nos pacientes com lesão ativa (ψ : $P = 0,494$), após a quimioterapia (ψ : $P = 0,001$) e curados espontaneamente (ψ : $P = 0,009$) em relação ao antígeno solúvel.

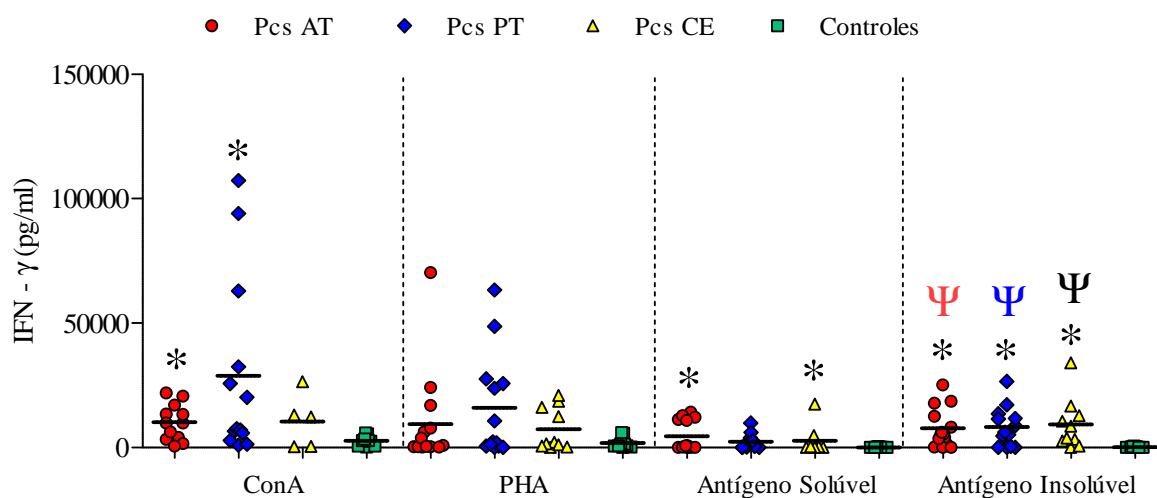


Figura 13: Produção de IFN- γ entre os grupos de pacientes com lesão ativa (Pcs AT), após o tratamento (Pcs PT), pacientes curados espontaneamente (Pcs CE) e grupo Controle, em resposta aos mitógenos ConA e PHA e antígenos solúvel e insolúvel.

Nota: os asteriscos representam as diferenças significativas entre pacientes e grupo controle, e a letra grega ψ (psi) representa as diferenças significativas nos grupos de pacientes em resposta aos diferentes antígenos ($P < 0,05$). As barras horizontais representam as médias dos grupos.

6.3.2.2 Fator de necrose tumoral-alfa

A produção de TNF sob estímulo de ConA foi significativa nos pacientes tratados em comparação ao momento antes da terapia ($P = 0,004$). Também foi encontrada diferença estatística ao comparar os pacientes pós-tratamento tanto aos pacientes curados espontaneamente ($\Xi_1: P = 0,005$) quanto ao grupo controle ($P = 0,001$). Em contrapartida, os pacientes com lesão ativa demonstraram níveis de TNF- α similares aos apresentados pelo grupo controle. Resultado semelhante foi encontrado ao comparar os pacientes com regressão espontânea da lesão e o grupo controle (Figura 14).

Em resposta a PHA, os níveis de TNF- α foram significativos nos pacientes após o tratamento em relação a antes do tratamento ($\Xi_2: P = 0,008$), como demonstra a Figura 14. Também houve diferença significativa ao comparar os pacientes após a quimioterapia tanto com os controles ($P = 0,0001$) como com os pacientes com cura espontânea ($\Xi_3: P = 0,017$) quanto aos. A produção de TNF- α também foi significativa nos pacientes com lesão ativa ($P = 0,001$) em relação ao grupo controle. Embora os indivíduos curados espontaneamente tenham apresentado níveis maiores da citocina em comparação ao grupo controle, não houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$).

A Figura 14 mostra também a produção de TNF- α frente aos antígenos. O antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* induziu de forma significativa a produção de TNF- α nos pacientes antes ($P = 0,008$) e após o tratamento ($P = 0,0003$) em comparação ao grupo controle. Embora os pacientes com cura espontânea tenham exibido maior concentração da citocina em relação aos indivíduos saudáveis, não foi observada diferença estatística. Também não houve diferença ao comparar os pacientes em ambos os momentos aos curados espontaneamente ($P > 0,05$).

Frente ao antígeno insolúvel, a produção de TNF- α nos pacientes antes ($P = 0,007$) e após o tratamento ($P = 0,003$) foi significativa em comparação ao grupo controle. Os pacientes tratados exibiram níveis significativos da citocina ($\Xi_4: P = 0,035$) ao comparar com o grupo de indivíduos curados espontaneamente. Os pacientes com regressão espontânea exibiram maior concentração da citocina em relação aos indivíduos saudáveis, ainda que sem diferença estatística. Também não houve diferença ao comparar os pacientes antes da quimioterapia aos curados espontaneamente ($P > 0,05$) (Figura 14).

Ao comparar os níveis de TNF- α induzidos pelos antígenos em cada grupo, observou-se que após o tratamento houve um discreto aumento nos níveis de TNF- α em relação ao momento antes do tratamento, embora sem diferença estatística ($P > 0,05$). O antígeno insolúvel induziu produção significativa de TNF- α em relação ao solúvel no grupo de pacientes, tanto antes ($P = 0,010$) como após a quimioterapia ($P = 0,004$) (Figura 14).

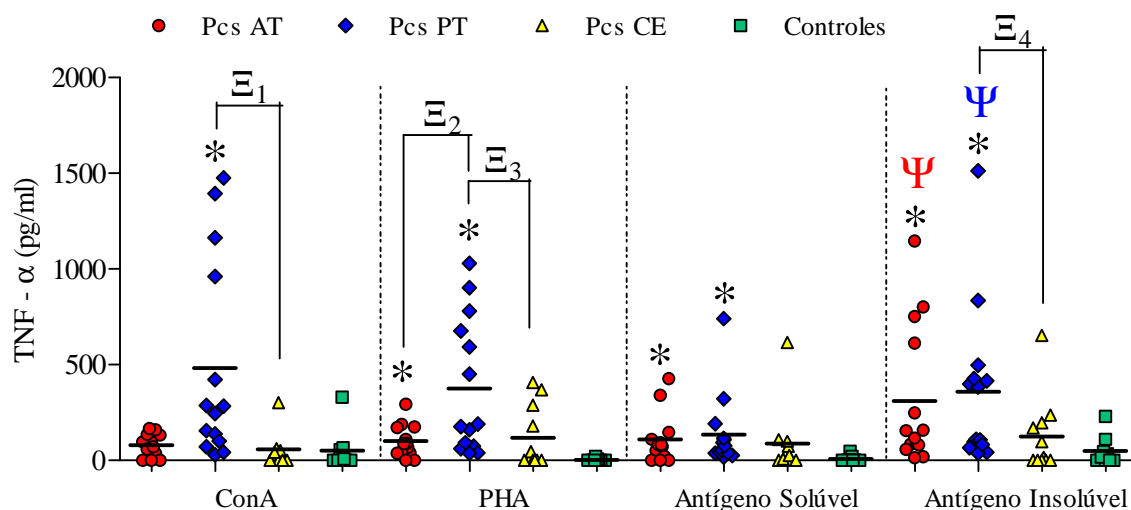


Figura 14: Produção de TNF- α entre os grupos de pacientes com lesão ativa (Pcs AT), após o tratamento (Pcs PT), pacientes curados espontaneamente (Pcs CE) e grupo Controle, em resposta aos mitógenos ConA e PHA e antígenos solúvel e insolúvel.

Nota: em cada estímulo, os asteriscos representam as diferenças significativas entre pacientes e grupo controle, e a letra grega Ξ (ksi) mostra as diferenças significativas entre os grupos de pacientes ($P < 0,05$). Já os níveis significativos nos grupos de pacientes em resposta aos diferentes antígenos são indicados pela letra grega Ψ (psi) ($P < 0,05$). As barras horizontais representam as médias dos grupos.

6.3.2.3 Interleucina-2

Como mostra a figura 15, a produção de IL-2 em resposta a ConA foi observada em pequenos níveis em todos os grupos estudados. Em todas as comparações realizadas entre eles, não foi observada diferença significativa.

Sob estímulo com PHA, foi evidenciada diferença estatística ao comparar os pacientes antes e após o tratamento (Ξ_5 : $P = 0,023$). Os pacientes com lesão ativa exibiram níveis significativos de IL-2 tanto em relação ao grupo controle ($P = 0,041$) quanto aos curados espontaneamente (Ξ_6 : $P = 0,0384$) (Figura 15).

Todos os grupos analisados produziram IL-2 em pequenas concentrações sob estimulação de ambos os antígenos (Figura 15). Porém, apenas os pacientes com lesão ativa apresentaram níveis significativos da citocina em relação aos controles, sob estímulo do antígeno insolúvel ($P = 0,021$). Em todas demais análises realizadas, não houve diferença significativa entre os grupos.

Embora sob estimulação do antígeno insolúvel os grupos de pacientes tenham produzido maiores níveis de IL-2 em comparação à produção da citocina frente ao antígeno solúvel, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) (Figura 15).

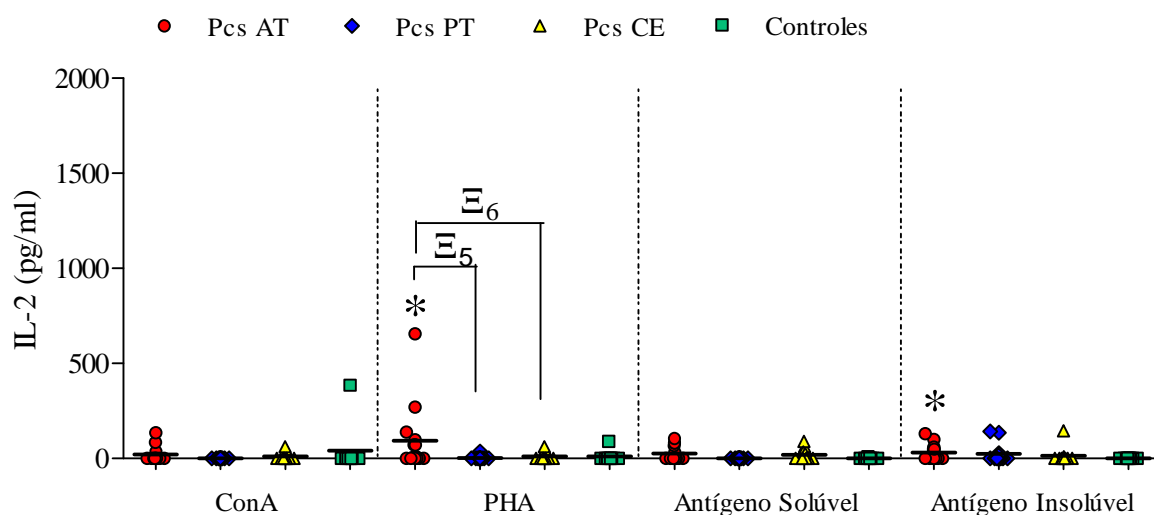


Figura 15: Produção de IL-2 entre os grupos de pacientes com lesão ativa (Pcs AT), após o tratamento (Pcs PT), pacientes curados espontaneamente (Pcs CE) e grupo Controle, em resposta aos mitógenos ConA e PHA e antígenos solúvel e insolúvel.

Nota: em cada estímulo, os asteriscos representam as diferenças significativas entre pacientes e grupo controle, e a letra grega Ξ (ksi) mostra as diferenças significativas entre os grupos de pacientes ($P < 0,05$). As barras horizontais representam as médias dos grupos.

6.3.2.4 Interleucina-10

A produção de IL-10 sob estímulo da ConA, tanto nos pacientes com lesão ativa quanto após a quimioterapia, foi maior que nos indivíduos saudáveis, embora sem diferença significativa. Foram observadas maiores concentrações da citocina antes da quimioterapia ao comparar com o momento pós-tratamento, ainda que sem diferença estatística. Em relação ao grupo controle, os pacientes com cura espontânea produziram IL-10 em níveis significativos ($P = 0,040$). Da mesma forma, diferença estatística foi constatada comparando-se os grupos de pacientes com lesão ativa (Ξ_7 : $P = 0,011$) e após a quimioterapia (Ξ_8 : $P = 0,022$) com os indivíduos curados espontaneamente (Figura 16).

O estímulo com PHA promoveu maiores níveis de IL-10 em todos os pacientes em relação ao grupo de indivíduos saudáveis, ainda que sem diferença significativa, como mostra a Figura 16. Também não houve diferença estatística nas comparações entre os grupos de pacientes ($P > 0,05$).

Como mostrado na figura 16, os pacientes com lesão ativa apresentaram, frente ao antígeno solúvel, níveis significativos de IL-10 em relação ao grupo controle ($P = 0,035$). Embora estes pacientes tenham produzido a citocina em maior concentração ao comparar com o momento após a quimioterapia, não foi observada diferença estatística. Também não houve diferença entre os níveis de IL-10 exibidos pelos pacientes tratados e curados espontaneamente em relação aos controles, bem como entre os pacientes antes e após o tratamento e os indivíduos curados espontaneamente ($P > 0,05$).

O antígeno insolúvel induziu maior produção de IL-10 em todos os grupos de pacientes em comparação aos controles, ainda que sem diferença significativa. O mesmo resultado estatístico foi observado ao comparar os pacientes antes e após o tratamento quimioterápico àqueles curados espontaneamente. Em contrapartida, foi verificada produção significativa de IL-10 nos pacientes com lesão ativa ao comparar com o momento pós-tratamento (Ξ_9 : $P = 0,034$) (Figura 16).

Realizando-se a comparação dos níveis de IL-10 produzidos em resposta aos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* em cada grupo, não foi evidenciada diferença significativa ($P > 0,05$), embora o antígeno solúvel tenha induzido maiores concentrações da citocina em relação ao insolúvel (Figura 16).

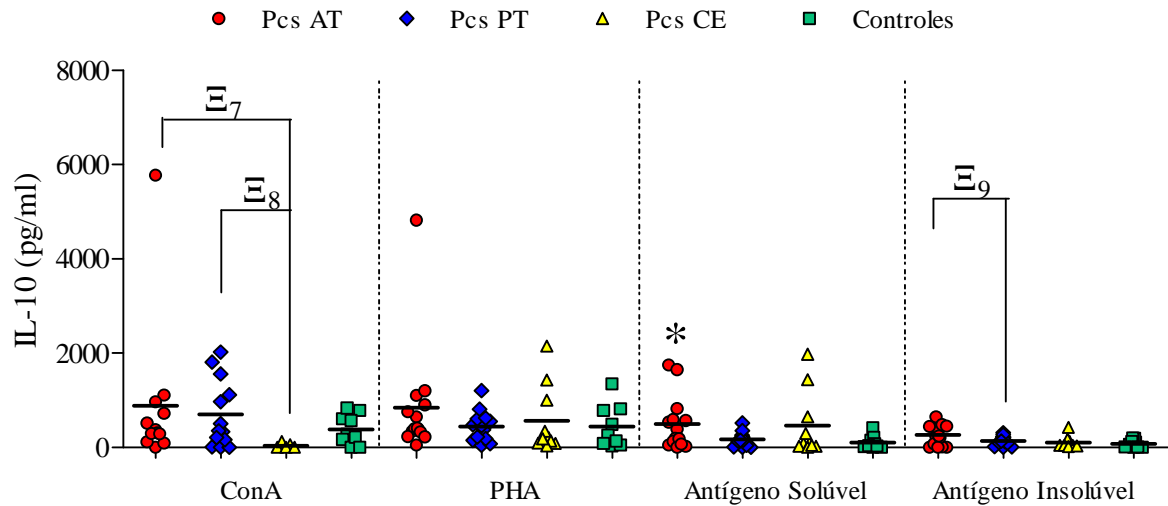


Figura 16: Produção de IL-10 entre os grupos de pacientes com lesão ativa (Pcs AT), após o tratamento (Pcs PT), pacientes curados espontaneamente (Pcs CE) e grupo Controle, em resposta aos mitógenos ConA e PHA e antígenos solúvel e insolúvel.

Nota: em cada estímulo, os asteriscos representam as diferenças significativas entre pacientes e grupo controle, e a letra grega Ξ (ksi) mostra as diferenças significativas entre os grupos de pacientes ($P < 0,05$). As barras horizontais representam as médias dos grupos.

6.3.3 Associação entre mediadores imunológicos e dados clínicos

Para avaliar a associação entre a produção citocinas e NO com o tamanho da lesão de pacientes com LTA ativa e com o resultado da IDRМ de pacientes curados espontaneamente, foi realizado o teste de correlação de Spearman ($P < 0,05$). Os resultados significativos são descritos nos tópicos a seguir.

6.3.3.1 Fator de necrose tumoral-alfa e tamanho de lesão

A produção de TNF- α frente ao antígeno solúvel demonstrou correlação inversa significativa ($P < 0,05$) com o tamanho das lesões apresentadas pelos pacientes antes do tratamento, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Análise de correlação entre a produção de TNF frente ao antígeno solúvel e a área das lesões de pacientes com LTA ativa.

	N	Correlação (r_s)	Valor de P
TNF (pg/ml)	13		
Área lesões (mm ²)	12	-0,571	0,049

Nota: r_s = Coeficiente de correlação de Spearman; N = número de pacientes

6.3.3.2 Interleucina-2 e resultado da IDRМ

Analisando-se a correlação entre os níveis de IL-2 produzidos sob estímulo de ambos os antígenos e o resultado da IDRМ de pacientes com cura espontânea, observou-se relação inversa significativa entre as variáveis ($p < 0,05$), como indicado nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Análise de correlação entre a produção de IL-2 frente ao antígeno solúvel e o resultado da IDRМ em pacientes curados espontaneamente.

	N	Correlação (r_s)	Valor de P
IL-2 (pg/ml)	11	-0,615	0,044
IDRМ (mm)	11		

Nota: r_s = Coeficiente de correlação de Spearman; N = número de pacientes

Tabela 5. Análise de correlação entre a produção de IL-2 frente ao antígeno insolúvel e o resultado da IDRМ em pacientes curados espontaneamente.

	N	Correlação (r_s)	Valor de P
IL-2 (pg/ml)	11	-0,683	0,021
IDRМ (mm)	11		

Nota: r_s = Coeficiente de correlação de Spearman; N = número de pacientes

Em resposta ao antígeno insolúvel, houve produção significativa de NO por parte do grupo de pacientes em relação ao controle em 72 horas e 6 dias de cultivo (ambos $P = 0,0079$) (Figura 18). Porém, uma vez que os pacientes produziram níveis de NO discretamente menores em relação ao grupo controle frente ao antígeno insolúvel em 72 horas de cultivo, pode-se optar pelo tempo de 6 dias para as próximas dosagens de NO utilizando-se ambos os antígenos.

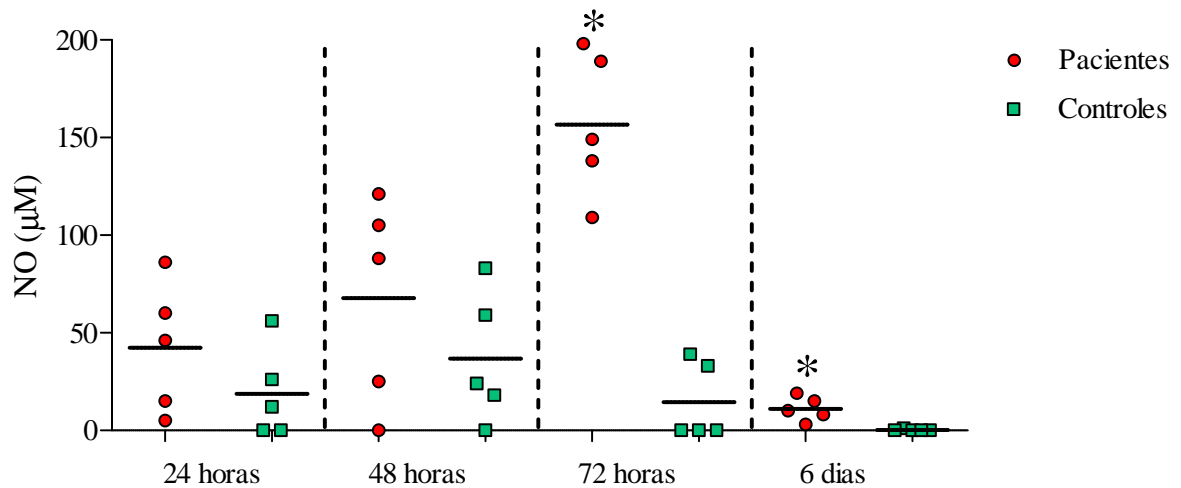


Figura 18: Padronização da detecção nitrito produzido por PBMC de pacientes com lesão ativa e do grupo controle após estímulo com o antígeno insolúvel de *L. (V.) braziliensis*.

Nota: em cada tempo, os asteriscos representam as diferenças significativas entre os pacientes e o grupo controle ($P < 0,05$). As barras horizontais representam as médias dos grupos.

6.4.2 Produção de óxido nítrico na LTA ativa e após cura clínica

A determinação indireta dos níveis de NO foi realizada nos sobrenadantes de culturas de PBMC estimuladas durante seis dias com ConA (2,5µg/ml), PHA (5,0µg/ml) e antígenos solúvel (1,25µg/ml) e insolúvel (2,5µg/ml) de *L. (V.) braziliensis*. Para os pacientes com lesão ativa a análise foi realizada antes e após um ano do término do tratamento quimioterápico. Os sobrenadantes dos pacientes de cura espontânea e do grupo controle foram avaliados em apenas um momento.

Os pacientes com lesão ativa ($P = 0,036$) e os pacientes curados espontaneamente ($P = 0,006$) apresentaram produção significativa de NO em relação aos indivíduos saudáveis em resposta a ConA. Os pacientes tratados exibiram menores níveis de NO em comparação aos pacientes com cura espontânea, com diferença estatística significativa entre os grupos (Ξ_{10} : $P = 0,042$). Em contraste, a produção do radical foi maior nos pacientes com lesão ativa em comparação ao momento pós-quimioterapia, embora sem diferença significativa ($P > 0,05$, Figura 19).

A produção de NO frente a PHA se mostrou significativa nos pacientes curados espontaneamente em relação ao grupo controle ($P = 0,019$). Embora esta relação tenha sido semelhante ao comparar os pacientes com lesão ativa tanto com os mesmos após o tratamento quanto com os controles, não foi constatada diferença significativa entre os grupos. (Figura 19).

A Figura 19 mostra também a produção de NO frente aos antígenos. O antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* induziu produção significativa de NO nos pacientes curados espontaneamente em relação aos pacientes antes (Ξ_{11} : $P = 0,023$) e após a quimioterapia (Ξ_{12} : $P = 0,001$). Os pacientes com cura espontânea produziram o radical também em níveis significativos quando comparados ao grupo controle ($P = 0,0007$). Embora o NO tenha sido produzido em maior concentração nos pacientes antes e após o tratamento em comparação com os controles, não houve diferença estatística ($P > 0,05$). Também não houve diferença ao comparar os pacientes antes e após o tratamento.

Em resposta ao antígeno insolúvel, os pacientes com lesão ativa (Ξ_{13} : $P = 0,048$) exibiram níveis significativamente maiores de NO em comparação ao momento após a quimioterapia. Tanto os indivíduos curados espontaneamente ($P = 0,0410$) quanto os pacientes com lesão ativa ($P = 0,012$) produziram NO em maiores concentrações em relação ao controle, com diferença significativa entre os grupos. Os pacientes com cura espontânea,

por sua vez, produziram o radical com significância estatística ao comparar com os pacientes tratados (Ξ_{14} : $P = 0,008$).

Ao realizar a análise dos níveis de NO induzidos por ambos os antígenos de *L. (V.) braziliensis* nos grupos de pacientes, foram verificados níveis significativos do radical frente ao antígeno solúvel nos pacientes com cura espontânea (ψ : $P = 0,011$) em comparação com o antígeno insolúvel. Em todos os outros grupos, as concentrações de NO induzidas por ambos os antígenos foram similares.

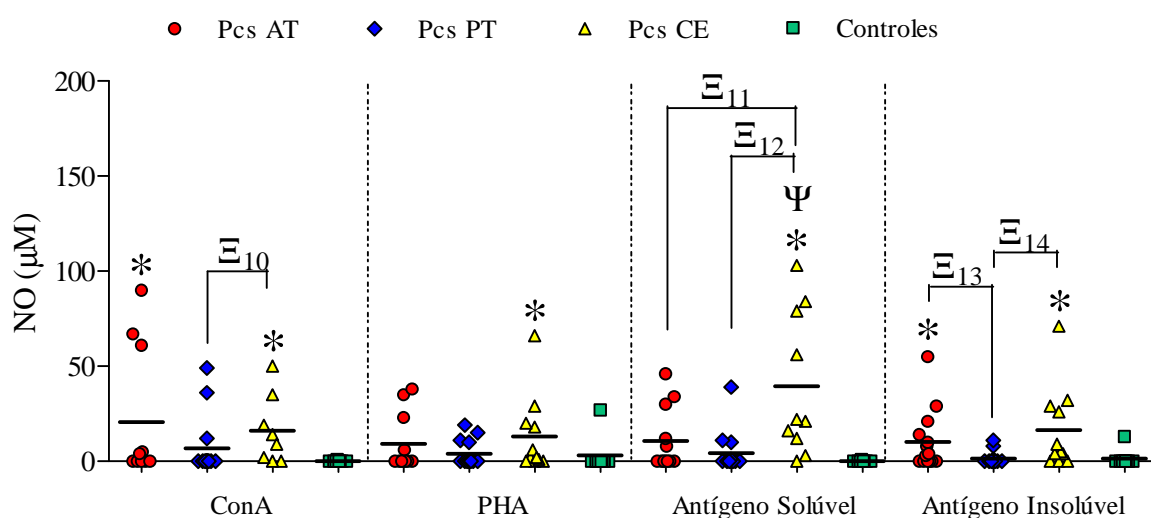


Figura 19: Produção de NO entre os grupos de pacientes com lesão ativa (Pcs AT), após o tratamento (Pcs PT), pacientes curados espontaneamente (Pcs CE) e grupo controle, em resposta aos mitógenos ConA e PHA e antígenos solúvel e insolúvel.

Nota: em cada estímulo, os asteriscos representam as diferenças significativas entre pacientes e grupo controle, e a letra grega Ξ (ksi) mostra as diferenças significativas entre os grupos de pacientes ($P < 0,05$). Já os níveis significativos nos grupos de pacientes em resposta aos diferentes antígenos são indicados pela letra grega ψ (psi) ($P < 0,05$). As barras horizontais representam as médias dos grupos.

7 DISCUSSÃO

Na leishmaniose, um dos fatores chave para a determinação das manifestações clínicas e o curso da infecção é a espécie causadora da doença (ROCHA et al., 2007). Em Pernambuco, *L. (V.) braziliensis* permanece, até o momento, como o único agente etiológico da LTA. Como característica principal, a doença se apresenta sob um espectro de manifestações que, em relação à gravidade, varia desde lesões cutâneas localizadas até o comprometimento de mucosas (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; REITHINGER et al., 2007).

Além dessas manifestações, a ocorrência da cura espontânea em pacientes com leishmaniose cutânea tem sido documentada em áreas endêmicas de infecção por *L. (V.) braziliensis* (BRITO et al., 2001; CARVALHO et al., 1995; GOMES-SILVA et al., 2007), embora seja descrito que espécies deste subgênero causam lesões mais difíceis de regredir espontaneamente, além do potencial risco de desenvolvimento para a forma mucocutânea (MELBY et al., 2002). Diante da escassez de estudos recentes envolvendo pacientes curados espontaneamente, e na tentativa de melhor compreender os mecanismos envolvidos com a cura na LTA, foram avaliados neste estudo pacientes com doença ativa e um ano após o tratamento, bem como indivíduos que obtiveram cura clínica espontânea.

De forma contrária a trabalhos anteriores (GUIMARÃES et al., 2009; REIS et al., 2008; RODRIGUES et al., 2006), a doença foi notificada em igual número de pacientes de ambos os sexos no grupo com doença ativa, e em maior número de pacientes do sexo feminino no grupo com cura espontânea. Este dado pode ser reflexo da crescente participação feminina em atividades agrícolas (SALES, 2007). A maior parte dos pacientes de ambos os grupos trabalhava em zonas rurais, e todos eram procedentes de municípios próximos a áreas de Mata Atlântica.

Eventos como exploração desordenada de florestas, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias e residuais exercem grande influência sobre a transmissão da LTA, que acontece segundo padrões epidemiológicos. Além destes fatores, a falta de saneamento básico, água tratada e acesso às condições básicas de saúde contribuem para o estabelecimento do caráter endêmico da doença (BRASIL, 2007).

Quando se refere à quimioterapia, para todas as formas da leishmaniose, o tratamento clássico é realizado através da administração de antimoniais pentavalentes. No Brasil, a droga de primeira linha é o antimoniato de n-metilglucamina, ou Glucantime®. No presente trabalho, antes da quimioterapia, todos os pacientes apresentavam a forma cutânea localizada

da LTA. Mais de 64% dos pacientes deste grupo desenvolveram apenas uma lesão característica, com tempo de evolução entre oito dias e três meses e situada, na maioria das vezes, nos membros inferiores. Este perfil de aparecimento das lesões no corpo pode ser entendido pelo envolvimento dos pacientes em atividades no campo, onde os trabalhadores, na maioria das vezes, dispensam o uso de vestimentas que cobrem toda a superfície corporal. Além disso, o tempo decorrido entre o aparecimento da lesão e a procura pelos serviços de saúde foi similar ao encontrado em trabalhos anteriores (ANTONELLI et al., 2005; DA-CRUZ et al., 2002; DORVAL et al., 2006), o que reflete o aumento do conhecimento dos pacientes sobre a existência da doença nos últimos anos (BASANO; CAMARGO, 2004). Assim como no presente estudo, a elevada frequência de casos de leishmaniose cutânea foi registrada em diversos outros trabalhos (ANTONELLI et al., 2005; DA-CRUZ et al., 2002; LEOPOLDO et al., 2006; REIS et al., 2009).

Após a avaliação clínica e coleta de sangue venoso, os pacientes foram submetidos ao esquema terapêutico com Glucantime®, que teve duração variável entre um e quatro ciclos, de acordo com a resposta terapêutica de cada paciente. BERMAN (2003) sugere que esta resposta possa variar com a idade, principalmente em infecções por parasitos pertencentes ao gênero *Viannia*, embora esta relação não tenha sido observada no presente estudo. Acredita-se também que fatores inerentes ao parasito, ao hospedeiro e à utilização da medicação interferem no sucesso da quimioterapia (RODRIGUES et al., 2006).

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

Após a administração do antimonial, o critério de cura utilizado no presente trabalho foi o clínico, caracterizado pela completa cicatrização da lesão. Com a finalidade de assegurar a cura e verificar o aparecimento de novas lesões em áreas próximas à cicatriz (recidivas), foi realizado o acompanhamento dos indivíduos tratados durante ano após o término do esquema terapêutico (BRASIL, 2007). Em 92,3% dos pacientes foi relatada a cura clínica, não sendo verificada a ocorrência de nenhuma recidiva.

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

O monitoramento dos indivíduos tratados é observado também em outros trabalhos, porém com variação desde o final imediato da terapia até três meses contados a partir do término do tratamento (D'OLIVEIRA JUNIOR et al., 2002; TOLEDO et al., 2001). Em comparação com os resultados deste trabalho, observações pós-terapêuticas em períodos menores que um ano podem se mostrar insatisfatórias, pois 90% das recidivas ocorrem em até um ano depois da finalização do tratamento e cicatrização das lesões (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MENDONÇA et al., 2004; SCHUBACH et al., 1998).

Em relação aos pacientes com cura espontânea participantes deste estudo, todos apresentaram, no momento da avaliação clínica, cicatrizes características da LTA, além de relatarem história pregressa da doença. Na maior parte dos indivíduos, a cicatrização da lesão se deu em até três meses. A rapidez em processos de cura espontânea foi observada, similarmente, por Carvalho et al. (1995). Durante uma epidemia ocorrida em área de transmissão para *L. (V.) braziliensis*, a cura sem o uso do medicamento foi notificada pelos autores em pacientes após um período de doença ativa igual ou inferior a três meses.

A positividade para a IDRМ foi de 100% nos pacientes curados espontaneamente. Em associação ao exame clínico, a IDRМ é utilizada para a definição de casos de cura espontânea. O resultado positivo da reação auxilia o diagnóstico diferencial, uma vez que o aspecto da cicatriz pode ser confundido com outras doenças. A reação, que denuncia a presença de resposta imune celular frente à *Leishmania*, permanece positiva nos pacientes cuja lesão regrediu sem a necessidade de tratamento quimioterápico (BRASIL, 2007).

Sabe-se que uma eficiente resposta imune mediada por células é requerida para a eficácia de antimoniais pentavalentes no tratamento da leishmaniose (BERGER; FAIRLAMB, 1992; COUTINHO et al., 1996, 1998; TOLEDO et al., 2001). Portanto, o *status* imunológico do hospedeiro infectado por *Leishmania* pode desempenhar um importante papel no sucesso da quimioterapia.

Em modelo murino, considerado o melhor para estudos de resposta imune frente à infecção por *L. major*, é bem fundamentado que a resposta imune celular desempenha um importante papel no desfecho da leishmaniose. A população celular envolvida nesta resposta é predominantemente de células T e, de acordo com a linhagem de camundongos estudada, um perfil Th1 ou Th2 de produção de citocinas irá se desenvolver (COUTINHO et al., 1998).

Em contraposição, o desenvolvimento de um modelo experimental dedicado a estudos imunológicos sobre a infecção por *L. (V.) braziliensis* é dificultado por fatores relacionados tanto ao parasito quanto da manutenção em cultura prolongada. Poucos trabalhos obtiveram

sucesso em realizar esta infecção, observando resultados semelhantes àqueles observados no hospedeiro humano (DEKREY et al., 1998; MOURA et al., 2005).

Em virtude desta dificuldade, a resposta imune desencadeada na infecção por *L. (V.) braziliensis* é cada vez mais estudada em pacientes (CARVALHO et al., 1985; CONCEIÇÃO-SILVA et al., 1990; COUTINHO et al., 1996; MENDONÇA et al., 1986; REIS et al., 2009; TELINO et al., 2005; TOLEDO et al., 2001). Ainda que apresente alto grau de complexidade, a resposta imune em todas as formas clínicas da LTA é dependente de células T e, de maneira geral, é aceito que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* está relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2 (BACELLAR et al., 2002; PIRMEZ et al., 1993).

Considerando-se que o papel das células T é importante na LTA, que a doença é endêmica em Pernambuco, que *L. (V.) braziliensis* é, até o momento, o seu único agente etiológico no Estado, nosso grupo vem realizando a caracterização da resposta imune celular na LTA ativa e após cura clínica frente aos antígenos solúvel (AgSol) e insolúvel (AgIns) de *L. (V.) braziliensis*.

Em estudos anteriores, Brito et al. (2000; 2001) detectaram o decaimento dos níveis de anticorpos contra as proteínas de 27 e 30 kDa do AgSol ao comparar soros de pacientes com lesão ativa e após tratamento quimioterápico. Perfil similar de resposta anticórpica foi observado em pacientes curados espontaneamente. Já em resposta à proteína de 19kDa do AgIns, esses pacientes apresentaram um aumento dos níveis de anticorpos. Em função destes resultados, os autores sugerem o uso dos antígenos como marcadores de cura.

Ainda que sejam observados títulos de anticorpos frente aos antígenos solúvel e insolúvel, é importante salientar que o papel da resposta humoral na evolução clínica da LTA não está totalmente definido (TRUJILLO et al., 1999). Dada a predominância de células T na resposta imune desenvolvida frente ao parasito, há a necessidade de dar continuidade à caracterização dessa resposta em pacientes com doença ativa ou após cura clínica. Esperou-se, com este estudo, detectar possíveis parâmetros na resposta imune associados à cura obtida tanto após a quimioterapia quanto de forma espontânea, condições que sugerem o desenvolvimento de resposta imune protetora (CARVALHO et al., 1995).

A resposta imune na LTA humana vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisa utilizando-se, com frequência, PBMC estimuladas com antígenos totais de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (DA-CRUZ et al., 2002; TELINO et al., 2005; TOLEDO et al., 2001). Em contraste, recentemente nosso grupo observou resposta linfoproliferativa e

produção de IFN- γ e IL-10 específicas por pacientes antes e após tratamento, sob estímulo do AgSol (REIS et al., 2009).

Um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na cura ou progressão da LTA pode ser obtido com o uso de antígenos com diferentes composições na avaliação da resposta imune. Desta forma, no presente estudo a produção *in vitro* de IFN- γ e IL-10 foi também avaliada, bem como de TNF- α , IL-2 e de óxido nítrico, em resposta aos antígenos solúvel e insolúvel. Acredita-se que, por ser constituído de fragmentos de membrana da *Leishmania*, o AgIns seja mais imunogênico que o primeiro, formado por proteínas do citoplasma do parasito (TELINO et al., 2005).

Avaliando-se a produção das citocinas e de NO frente aos mitógenos, foram observadas diferenças significativas entre os grupos. A ConA e a PHA são mitógenos policlonais que têm sido amplamente utilizados em estudos *in vitro* de ativação de células. Induzem mitose por um mecanismo que é dependente de TCR e nem todas as células T sofrem esse processo (PAUL, 1999). Assim, as diferenças estatísticas encontradas na produção das citocinas podem ser explicadas por esse fato, ou seja, os mitógenos não estimularam a mitose igualmente nesses grupos.

A principal característica da infecção por *Leishmania* é a colonização de células do sistema monocítico fagocitário (SMF), especialmente macrófagos, pelas formas amastigotas do parasito. Este evento faz com que o controle da infecção seja dependente da resposta imune mediada por células (BRASIL, 2007). Dessa forma, é a partir da ativação macrofágica via IFN- γ secretada por células T que ocorre a eliminação parasitária. Esta citocina é fundamental no estabelecimento e manutenção de uma resposta Th1 protetora (CASTELLANO et al., 2009).

Em resposta ao antígeno solúvel, a produção de IFN- γ por PBMC dos pacientes antes da quimioterapia e de cura espontânea foi significativa em relação ao grupo controle. Este grupo apresentou também menores níveis da citocina em comparação aos pacientes pós-tratamento, embora sem significância estatística. Já sob estímulo do AgIns, houve diferença significativa na produção IFN- γ de todos os pacientes quando comparados ao grupo controle.

Por conta da infecção por *Leishmania*, sugere-se que as PBMC dos pacientes tenham estabelecido uma resposta imunológica com a finalidade de combater o parasito. No momento da cultura, as células dos pacientes foram novamente desafiadas ao serem mantidas na presença de ambos os antígenos. Isto pode explicar o aumento da produção de IFN- γ por PBMC de pacientes, e sugere a formação de uma memória imunológica, uma vez que os

indivíduos saudáveis, sem história prévia da doença, exibiram níveis mínimos da citocina em resposta aos antígenos.

Ao comparar as médias de IFN- γ antes e após o tratamento quimioterápico, percebeu-se que, frente ao AgSol, ocorreu uma diminuição da citocina no segundo momento. Resultado inverso foi observado com o AgIns, onde a resposta pós-tratamento mostrou-se discretamente aumentada. Este mesmo perfil para ambos os antígenos foi verificado ao comparar os pacientes no momento da lesão ativa e os pacientes com regressão espontânea. Em todas estas comparações, não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

Uma vez que pacientes com a forma cutânea localizada conseguem estabelecer uma resposta Th1 benéfica, no decorrer da quimioterapia é esperada a gradativa destruição dos parasitos via macrófagos, com consequente depleção da carga parasitária. A ocorrência deste evento pode justificar a diminuição dos níveis de IFN- γ frente ao AgSol nos pacientes após o tratamento, como visto também por Reis et al. (2009), bem como nos pacientes curados espontaneamente. Embora nesses pacientes a medicação não tenha sido administrada, sugere-se que os mesmos apresentem uma modulação da resposta imune, alcançando a cura clínica (GOMES-SILVA et al., 2007).

Por outro lado, autores postulam que a diminuição da carga de parasitos pelo uso de antimoniais pode contribuir para o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1, com maior produção de IFN- γ após a quimioterapia (COUTINHO et al., 1996; COUTINHO et al., 1998; DA-CRUZ et al., 2002). Além disso, outras investigações demonstraram o desenvolvimento de uma resposta Th1 induzida por IL-12 facilitada pelo decaimento da população parasitária (SCOTT, 1994). Estas observações podem justificar o crescimento nos níveis da citocina nos pacientes após o tratamento e com regressão espontânea frente ao AgIns vistos neste estudo.

Em estudos anteriores onde foi observado o mesmo aumento, foi utilizado o antígeno total obtido a partir de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (DA-CRUZ et al., 2002; TELINO et al., 2005; TOLEDO et al., 2001). Como este não passa por processos diferenciados de centrifugação para separação de componentes de membrana (porção insolúvel) e citoplasmáticos (porção solúvel), pode-se sugerir que sua imunogenicidade advém da existência de porções de membrana do parasito na preparação antigênica.

Diante disto foi realizada a comparação dos níveis de citocinas e de NO induzidos pelos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. Nos três grupos de pacientes foi observada uma maior produção de IFN- γ frente ao AgIns, em comparação ao AgSol. A partir destes resultados, pode-se sugerir que o AgSol estimulou com menor intensidade a resposta

Th1. Além disso, pode haver nesses pacientes um maior número de populações celulares com memória imunológica para componentes do AgIns (RODRIGUES, 2000).

Além de IFN- γ , os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α também foram mensurados neste estudo. Esta proteína é secretada por macrófagos e linfócitos, cuja produção é aumentada pelo IFN- γ (BACELLAR et al, 2002). Várias evidências mostram que IFN- γ e TNF- α são importantes para o controle da leishmaniose. Em modelo murino, sugere-se que as duas citocinas atuem sinergicamente, mediando assim a eliminação dos parasitos através da indução de óxido nítrico (BRUNET, 2001; LIEW et al., 1990). Há também sugestões sobre a presença de uma resposta tipo Th1 em pacientes curados espontaneamente e com infecção subclínica por *L. (V.) braziliensis* (COUTINHO et al., 1998).

No presente estudo, em resposta a ambos os antígenos, os pacientes antes e após a quimioterapia produziram TNF- α em níveis estatisticamente significantes em comparação os indivíduos sadios. Embora a média apresentada pelo grupo controle tenha sido menor em relação aos pacientes curados espontaneamente, não foi observada diferença significativa. Semelhantemente aos resultados obtidos com IFN- γ , sugere-se a presença de células de memória na resposta imune desses pacientes.

Em relação aos pacientes antes e após tratamento, houve um discreto aumento da produção de TNF- α no segundo momento, também frente a ambos os antígenos. Já os pacientes curados espontaneamente produziram a citocina em menores concentrações em relação aos pacientes tratados. Uma explicação para estes resultados pode ser a possível influência do tratamento com antimoniais na secreção de citocinas pró-inflamatórias, o que pode não ocorrer nos pacientes que obtiveram regressão espontânea da lesão, os quais apresentaram baixos níveis de TNF- α (KOCYIGIT et al., 2002).

Postula-se que, para haver a adequada estimulação dos macrófagos, a produção de citocinas pró-inflamatórias é intensificada pela ação dos antimoniais. Em trabalho recente, foi demonstrado o aumento da produção *in vitro* do TNF- α na presença do Glucantime® e, por consequência, dos níveis de óxido nítrico. Além disso, a fagocitose das leishmanias é realizada via receptores do sistema Complemento. Em decorrência da droga, foi constatado um aumento na taxa de fagocitose, provavelmente por uma possível habilidade do antimonial em aumentar a expressão de receptores para o sistema Complemento na membrana dos fagócitos (MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008). Diante disto, pode haver uma imunoestimulação provocada pela droga, o que pode ser responsável pela potencialização de sua atividade microbicida (KOCYIGIT et al., 2002).

Ao comparar a produção de TNF- α sob estímulo de ambos os antígenos, os níveis da citocina mostraram-se significativamente maiores nos pacientes antes e após a quimioterapia, sob estímulo do AgIns. Assim como nos resultados obtidos na produção de IFN- γ , pode-se sugerir uma menor estimulação celular pelo AgSol, ou ainda presença de memória imunológica para determinantes antigênicos do AgIns.

A correlação entre a produção de TNF- α frente ao antígeno solúvel por PBMC de pacientes com LTA ativa e a área das lesões exibidas foi também avaliada no presente estudo. Foi constatada uma relação inversa entre as variáveis, ou seja, quanto maiores os níveis de TNF- α , menor a área das lesões. Este resultado pode ser justificado pela possível influência de fatores imunomoduladores (p. ex. IL-10) sobre a resposta Th1, especialmente sobre IFN- γ , o que contribui para a regressão da lesão ao final da quimioterapia. Em contraste com os nossos resultados, Antonelli et al. (2005) verificaram uma correlação direta entre a alta frequência de linfócitos produtores de TNF- α em pacientes com LTA ativa e o aumento da área de lesão (média de $403,73\text{mm}^2 \pm 348,62$). Os autores postulam que este tipo de relação pode indicar a contribuição da citocina para a injúria tecidual, a despeito de uma ativa regulação da resposta Th1 por IL-10.

Outra citocina importante no desenvolvimento da resposta imune na LTA é a IL-2, produzida quase exclusivamente por células T ativadas. A citocina promove proliferação de linfócitos, macrófagos e células *natural killer* (NK), além de participar da diferenciação de linfócitos T CD4+ em subtipos efetores Th1 ou Th2 (GAFFEN; LIU, 2004).

No presente estudo, embora detectada em pequenas concentrações em todos os grupos analisados, IL-2 foi mais produzida nos pacientes com lesão ativa ou curados espontaneamente em relação aos indivíduos sadios, após estimulação com o AgSol, sem significância estatística. Já frente ao AgIns, os pacientes antes do tratamento mostraram níveis significativos em relação ao controle, além de maior produção da citocina pelos pacientes tratados em relação ao controle, ainda que sem diferença estatística. Sob estímulo de ambos os antígenos, os pacientes com lesão ativa apresentaram maiores níveis de IL-2 em relação aos tratados ou com cura espontânea.

Além disso, a maior, embora discreta, produção de citocinas frente ao AgIns sugere um potencial imunogênico mais evidenciado, como ocorrido anteriormente nas outras citocinas analisadas. Pequenas concentrações de IL-2 foram também observadas por Nogueira et al., (2008), ao analisar fragmentos de pele de pacientes com LTA por imunohistoquímica. Os autores sugerem que IL-2 seja importante para a iniciação da resposta imune, mas não para sua manutenção. Assim, a citocina parece ser produzida e logo consumida.

Em contraste com os nossos resultados, Toledo et al. (2001) constatou maior produção de IL-2 após a quimioterapia. O autor sugere que o desenvolvimento da função citotóxica de células T CD8+, predominantes após a cura clínica, seja em decorrência da presença de IL-2, que ativa estas células.

Adicionalmente aos efeitos exercidos por IL-2 aos linfócitos, acredita-se que esta citocina estimule as células NK, culminando com altos níveis de IFN- γ (HOYER et al., 2008). Esta informação pode justificar a alta produção desta última citocina pelos pacientes deste estudo, observada frente ao antígeno insolúvel.

A produção de IL-2 frente a ambos os antígenos foi correlacionada inversamente ao resultado da IDRМ apresentado pelos pacientes de cura espontânea, ou seja, uma maior concentração da citocina pode levar a uma diminuição da enduração. Além do envolvimento de IL-2 com a indução da proliferação celular, sugere-se que a citocina também possa estar relacionada ao desenvolvimento e manutenção de células T regulatórias (T_{reg}) atuantes na reação de hipersensibilidade tardia (HOYER et al., 2008), o que pode explicar nossos resultados.

Durante a infecção por *Leishmania*, os macrófagos funcionam como importantes células efetoras no controle e eliminação dos parasitos. A produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos induz as células T e NK a produzirem IFN- γ . Sob ação desta citocina, os macrófagos, produtores de TNF- α , são ativados e induzidos a liberar óxido nítrico (GORAK; ENGWERDA; KAYE, 1998; HERWALDT, 1999; KANE; MOSSER, 2000; SCHARTON-KERSTEN; SCOTT, 1995). Este gás inorgânico possui função efetora na resposta imune contra patógenos quando catalisado pela segunda isoforma, a única induzível, da enzima óxido nítrico sintase (NOS-II ou iNOS). Embora efetiva, o NO é uma molécula instável, decompondo-se entre seis e trinta segundos. A partir deste evento surgem produtos finais mais estáveis, como o nitrito (NO₂⁻). Este tem sido utilizado na detecção indireta do NO através da reação colorimétrica de Griess.

Através deste método, foi observada, frente ao antígeno solúvel, uma concentração de nitrito levemente aumentada nos pacientes antes e após o tratamento ao comparar com os indivíduos saudáveis, mas sem diferença significativa. Em contrapartida, foi verificada produção significativa de NO pelos pacientes curados espontaneamente em relação aos demais grupos. Além disso, os pacientes antes do tratamento produziram níveis significativos de NO em comparação ao pós-tratamento.

O NO tem sua produção intensificada pela presença de IFN- γ e TNF- α , citocinas produzidas em maiores concentrações pelos pacientes integrantes deste estudo em relação aos

indivíduos saudáveis. Em relação ao AgIns, houve forte produção de citocinas pró-inflamatórias pelos grupos de pacientes. Em contrapartida, eles apresentaram pequenos níveis de NO em resposta a este antígeno. A partir destes resultados, pode-se sugerir que o NO exerce funções regulatórias sobre sua própria produção, evitando assim concentrações excessivas do reativo e consequente dano tecidual (COLEMAN, 2001; JAMES, 1995).

Nos pacientes com regressão espontânea da lesão, foram encontrados níveis significativamente menores de NO em resposta ao AgIns quando comparados aos resultados obtidos com o AgSol. Embora seja evidenciado o papel de IFN- γ na indução deste reativo, sugere-se que isto não aconteça por ação exclusiva desta citocina, uma vez que IL-2, produzida pelos pacientes curados espontaneamente frente ao AgSol, pode ter uma função acessória na ativação dos macrófagos (JAMES, 1995).

Embora a resposta Th1 seja benéfica, o controle da resposta inflamatória é essencial para a cura da doença. A produção de IL-10, inicialmente relacionada apenas ao favorecimento da sobrevivência parasitária no hospedeiro induzindo a desativação macrófagica, pode representar um contrabalanço necessário para a resolução da doença (ANTONELLI et al., 2004).

Sob estímulo do AgSol, os pacientes com doença ativa apresentaram produção significativa de IL-10 em relação ao grupo controle. Embora os pacientes tratados ou curados espontaneamente tenham apresentado maiores níveis de IL-10 ao serem comparados com os indivíduos saudáveis, não houve diferença significativa. No momento antes da quimioterapia, os pacientes apresentaram maiores níveis da citocina em comparação ao pós-tratamento, em resposta a ambos os antígenos. Porém, diferença estatística foi constatada apenas em resposta ao antígeno insolúvel.

O perfil de produção de citocinas na LTA parece ser definido de acordo com o antígeno utilizado. Uma vez que foi detectada reatividade anticórpica frente às proteínas de 27 e 30kDa do AgSol em pacientes com lesão ativa e de 19kDa do AgIns, postula-se que essas proteínas sejam responsáveis pelos diferentes perfis de citocinas exibidos pelos pacientes participantes do presente estudo. Já foi proposto anteriormente que o parasito apresenta antígenos que estimulam resistência específica à infecção (particulado ou insolúvel), além de outros que deprimem essa resistência (solúvel) (COOK; HOLBROOK, 1983; RODRIGUES, 2000). Assim, postula-se que os níveis de IL-10 apresentados pelos pacientes com lesão ativa frente ao antígeno solúvel regulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, necessárias para a cura da doença.

Por outro lado, IFN- γ e TNF- α foram mais produzidas em resposta ao antígeno insolúvel, o que indica um menor efeito regulador de IL-10. Em estudos anteriores, a diminuição desta citocina após a cura clínica foi também observada (COUTINHO et al., 1998; TOLEDO et al., 2001). Embora esta diferença tenha sido evidenciada, ambos os antígenos foram capazes de promover uma resposta imune benéfica, uma vez que todos os pacientes obtiveram a cura clínica após o tratamento ou de forma espontânea. É possível que outras citocinas, como o fator de crescimento e transformação- beta (TGF- β), estejam auxiliando na modulação dessa resposta, não havendo a progressão da doença para uma forma mais severa (REITHINGER et al., 2007).

Estudos anteriores demonstraram que, mesmo após a resolução da infecção por *Leishmania*, o parasito ainda persiste no hospedeiro, sugerindo que não existe a cura parasitológica (BELKAID et al., 2001; MENDONÇA et al., 2004). Este evento pode ser resultado da modulação da resposta imune exercida por células T regulatórias (T_{reg}), produtoras de IL-10 e TGF- β . Sob influência destas citocinas, a total eliminação parasitária não é alcançada, e assim alguns parasitos ainda continuam no hospedeiro (BELKAID; SUN; BOULADOUX, 2006).

Essa persistência foi verificada em cicatriz após cura clínica por Mendonça et al. (2004). Segundo este grupo, a persistência leva a questões no que se refere à evolução clínica, epidemiologia e controle da leishmaniose. O grupo também sugere que essa persistência poderia ser benéfica para pacientes residentes em áreas que a leishmaniose é endêmica em virtude da manutenção de células T de memória, embora haja a possibilidade de que pacientes curados clinicamente possam atuar como reservatórios do parasito em áreas de transmissão ativa.

Aparentemente, a *Leishmania* é mantida por um longo período pelo sistema imune com a finalidade de induzir a formação de células T de memória (SCOTT, 2005). Zaph et al. (2004) demonstraram, em modelo murino, que essa resposta obedece ao paradigma da subdivisão das células T de memória em populações de memória central (T_{CM}) e memória efetora (T_{EM}). As T_{CM} são definidas por não exigirem a presença constante de parasitos vivos para a sua manutenção. Em contraste, a presença de parasitos vivos é necessária para manter o *pool* de T_{EM}. Porém, ainda não está claro o papel dos antígenos residuais na conservação das T_{CM}.

Ainda que o perfil Th1 seja importante para a cura, sua exacerbação pode estar relacionada à patogênese da doença. Uma vez que as citocinas do perfil Th2 são capazes de inibir a diferenciação de linfócitos Th1, um possível contrabalanço entre os dois perfis pode

contribuir para o controle da infecção, caracterizando assim uma dicotomia Th1xTh2 (REIS et al., 2006). Além disso, alguns autores têm relatado a existência do perfil Th3, que produz TGF- β , IL-4 e IL-10 e induz a formação de células Treg. Porém, uma vez que as citocinas exibidas por essas células T são também produtos de outros perfis, a sua condição de linhagem distinta das anteriormente descritas é questionada e necessita maiores investigações (ZHU; PAUL, 2010).

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se sugerir que os pacientes com lesão ativa e após cura clínica, com ou sem quimioterapia, exibem diferentes perfis de resposta imune celular. A elevada produção de IFN- γ pelos pacientes sugere a presença de uma resposta predominantemente inflamatória, assim como em relação a TNF- α . Esta última citocina parece ser necessária para que o tratamento da LTA seja bem sucedido. Não obstante, a presença de IL-10 indica a indução de mecanismos de imunorregulação, além de existir uma possível auto-compensação da produção de NO nos pacientes curados espontaneamente.

Além do efeito imunossupressor exercido pelo parasito sobre o hospedeiro referente à produção de citocinas e de NO, sugere-se este mesmo efeito sobre a transcrição ou tradução de genes envolvidos na resposta imune contra a infecção (DIAZ-GUERRA et al., 2008). Assim, além da detecção de citocinas por ELISA de captura e de NO pelo método de Griess, é importante conhecer o perfil de expressão gênica para os mediadores imunológicos envolvidos com as diferentes evoluções clínicas da LTA. Em trabalhos futuros do nosso grupo, será realizada essa caracterização da resposta imune utilizando-se o PCR em tempo real. O estudo abrangerá não só os mediadores avaliados no presente estudo, mas também outros relacionados ao desenvolvimento de células T_{reg}, cuja participação é sugerida na resposta imune, com possível contribuição no controle das funções efetoras das células T (CAMPANELLI et al., 2006). Além disso, será também abordado o perfil Th17, recentemente descrito como importante na patogênese da doença em humanos, e sugerido como antagonico às células T_{reg} (BACELLAR et al., 2007, BETTELLI et al., 2008).

Outra importante abordagem é a caracterização fenotípica por citometria de fluxo das células responsivas aos antígenos de *L. (V.) braziliensis*. Segundo Da-Cruz et al. (1994), tanto as células T auxiliares (CD4+) quanto as citotóxicas (CD8+) proliferam em números significativos em resposta ao estímulo com antígenos de *Leishmania*. O mesmo grupo constatou que as células T CD4+ proliferaram em maior frequência que as células T CD8+ antes do tratamento quimioterápico, sendo encontrada situação semelhante em indivíduos saudáveis. Ao final da terapia, observou-se um aumento da população de células T CD8+ e um

declínio na população de células CD4+, sugerindo uma maior participação das células T citotóxicas nos processos de cura.

Em ensaios preliminares realizados pelo nosso grupo, foi observada maior presença de células T CD4+ em pacientes com lesão ativa sob estímulo dos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. As próximas investigações serão efetuadas tanto após o tratamento quimioterápico quanto em pacientes que obtiveram cura espontânea da LTA.

Tais análises serão feitas com objetivo de melhor caracterizar e compreender de forma mais completa a resposta imune na LTA em Pernambuco. Será verificada não só a influência do tratamento, mas também o perfil de resposta de pacientes curados espontaneamente.

Os resultados obtidos neste estudo e nos próximos a serem realizados podem contribuir para a busca de novas moléculas antigênicas capazes de induzir uma resposta imune protetora, podendo ser utilizadas no futuro para o desenvolvimento de tratamentos imunoterápicos e vacinas.

8 CONCLUSÕES

- a) Os antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* induziram resposta imune específica em PBMC de pacientes com LTA ativa e após cura clínica através da produção de citocinas e de óxido nítrico;
- b) Os pacientes com lesão ativa e após cura clínica, com ou sem quimioterapia, apresentam diferentes perfis de citocinas. Os níveis de IFN- γ indicam o predomínio de resposta inflamatória, e a produção de TNF- α após o tratamento sugere a importância desta citocina para o sucesso do tratamento. Já a presença de IL-10 indica a atuação de mecanismos de imunomodulação na resposta desses indivíduos;
- c) Os níveis de NO em pacientes curados espontaneamente sugerem um mecanismo de auto-compensação na produção deste radical, diante de uma baixa produção de IFN- γ e TNF- α por estes pacientes.

REFERÊNCIAS

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. 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.

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.

BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 production among patients with american cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 200, p. 75-78, 2007.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 25, p. 203-211, 2009.

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.328-337, 2004.

BELKAID, Y. et al. The Role of Interleukin (IL)-10 in the Persistence of *Leishmania major* in the Skin after Healing and the Therapeutic Potential of Anti-IL-10 Receptor Antibody for Sterile Cure. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 194, n. 10, p. 1497-1506, 2001.

BELKAID, Y.; SUN, C. M.; BOULADOUX, N. Parasites and immunoregulatory cells. **Current Opinion in immunology**, Philadelphia, v. 18, p. 406-412, 2006.

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

BERMAN, J. Current approaches in leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Philadelphia, v.16, p. 397-401, 2003.

BODAS, M. et al. Inhibition of IL-2 Induced IL-10 Production as a Principle of Phase-Specific Immunotherapy. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v.177, p. 4636-4643, 2006.

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

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

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

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, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: ecoepidemiological aspects in "Zona-da-Mata" region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 93, p. 488-494, 1999.

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. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2^a ed. Brasília, DF, 2007.

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. 18-321, 2000.

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.

BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 1, p. 1457-1467, 2001.

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**, Boston, v.193, p.1313-1322, 2006.

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

CARRIER, Y. et al. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. **Journal of Immunology**, New York, v. 178, n. 1, p. 179-85, 2007.

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

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

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

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of parasitic diseases. **Life cycle of *Leishmania***. Disponível em:
<<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>>. Acesso em: 15 nov 2009.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International immunopharmacology**, Amsterdam, v. 1, p. 1397-1406, 2001.

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

COOK, J. A.; HOLBROOK, T. W. Immunogenicity of soluble and particulate antigens from *Leishmania donovani*: effect of glucan as an adjuvant. **Infection and Immunity**, Washington, v. 40, n. 3, p. 1038-1043, 1983.

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

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, n. 1, p. 7-10, 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.

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.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. T. Analysis of the Immune Responses of Mice to Infection with *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 2, p. 827-829, 1998.

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

DIAZ-GUERRA, M. J. et al. Translation controlled mRNAs: new drug targets in infectious diseases? **Infectious Disorders Drug Targets**, Marseille, v. 8, n. 4, p. 252-261, 2008.

DORVAL, M. E. M. C. et al. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 43-46, 2006.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent Antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, Basel, v. 14, n. 7, p. 2317-36, 2009.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 5. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2000.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2002.

GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. **Cytokine**, London, v. 28, p. 109-123, 2004.

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. Leishmanose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.36, n.1, p.71-80, 2003.

GORAK, P. M.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 28, p. 687-695, 1998.

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

GUIMARÃES, L. H. et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.103, p. 712-715, 2009.

HANDMAN, E.; CEREDIG, R.; MITCHELL, G. F. Murine cutaneous leishmaniasis disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, Adelaide, v. 75, n.1, p.9-29, 1979.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, New York, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

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

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

HOYER, K. K. et al. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. **Immunological Reviews**, Malden, v. 226, p. 19-28, 2008.

JAMES, S. L. Role of Nitric Oxide in Parasitic Infections. **Microbiological Reviews**, Bethesda, v. 59, n. 4, p. 553-547, 1995.

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

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their plays to disrupt macrophage activation. **Current Opinion in Hematology**, Philadelphia, v. 7, p. 26-31, 2000.

KOCYIGIT, A. et al. Antimonial Therapy Induces Circulating Proinflammatory Cytokines in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 12, p. 6589-6591, 2002.

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: COLLIER L.; BALOWS A.; SUSSMAN M. (Ed.) **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases**. 9. ed. London: Arnold, 1998. p. 241-266.

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.

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

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

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

MELBY, P. C. Recent developments in leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Philadelphia, v.15, p. 485-490, 2002.

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

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

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.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I; PAULA-COELHO, V. N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, *in vitro*. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 8, p. 1633-1638, 2008.

NOGUEIRA, M. F. et al. Cytokine profile in montenegro skin test of patients with localized cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 6, p. 333-337, 2008.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis. **Burden of leishmaniasis**. 2003. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 17 nov 2009.

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

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

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, Brasília, DF, 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.

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. et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF, v. 41, n. 5, p. 439-443, 2008.

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.

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

ROCHA, F. J. S. et al. Cytokines, Signaling Pathways, and Effector Molecules required for the Control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 8, p. 3823-3832, 2007.

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

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

RODRIGUES, S. F. **Produção de IFN- γ e IL-10 “in vitro” na leishmaniose tegumentar americana**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RODRIGUES, A. M. et al. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2006.

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

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

SALES, C. M. V. Mulheres rurais: tecendo novas relações e reconhecendo direitos. **Estudos Feministas**, Florianópolis, v. 15, n. 2, p. 437-443, 2007.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon- γ that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.168, n. 1675-1684, 1993.

SCHARTON-KERSTEN, T.; SCOTT, P. The role of innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 57, 515-522, 1995.

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

SCOTT, P. The role of IL-12 in experimental leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, supl. 1, p. 9-10, 1994.

SCOTT, P.; FARREL, J. P. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. **Chemical Immunology**, Basel, v. 70, p. 60-80, 1998.

SILVEIRA, F. T. et al. Na outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) Lindembergi* n. sp. **Parasite**, Moulins, v. 9, p. 43-50, 2002.

SOUZA, A. et al. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 90, p.112-113, 1996.

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, N. A. et al. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 759-765, 2002.

TELINO, E. et al. *In vitro* responses of human peripheral blood mononuclear cells to whole-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, 2003.

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

VON STEBUT, E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Experimental Dermatology**, Malden, v. 16, p. 340-346, 2007.

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

WEINER, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. **Immunological Reviews**, Malden, v. 182, p. 207-214, 2001.

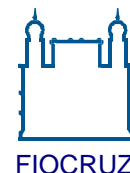
ZAPH, C. et al. Central memory T cells mediate long term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nature Medicine**, New York, v. 10, p. 1104-1110, 2004.

ZHU, J.; PAUL, W. E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. **Cell Research**, Shanghai, v. 20, p.4-12, 2010.



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

APÊNDICE A – TCLE Pacientes
Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente

Projeto: “Avaliação da produção *in vitro* de citocinas e de óxido nítrico na leishmaniose tegumentar americana ativa e após cura clínica, utilizando-se a fração antigênica insolúvel de *Leishmania (Viannia) braziliensis*”.

Eu,, concordo em participar como voluntário 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 ao teste de Montenegro, que é uma injeção sob a pele e que poderá causar ou não, após dois dias, o aparecimento de um “caroço” no local. Passarei também por exames como pesquisa direta, punção aspirativa e biópsia da borda da lesão, cuja coleta do material para realizá-los pode causar um pouco de dor ou desconforto. Serei então submetido a coleta de sangue venoso em volume equivalente a quatro colheres de sopa antes e após tratamento quimioterápico ou após cura clínica espontânea. 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. Vale ressaltar que todas as informações e os detalhes dos exames que serão realizados serão esclarecidos para mim.

Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema imunológico poderão ser usados 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

data

Assinatura do responsável

data

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

data

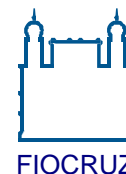
Endereço profissional: Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Moraes Rêgo, s/nº, Recife, fone: (81) 34215003.

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) 2101 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.

APÊNDICE B – TCLE Pacientes menores de 18 anos
Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente menor de 18 anos

Projeto: “Avaliação da produção *in vitro* de citocinas e de óxido nítrico na leishmaniose tegumentar americana ativa e após cura clínica, utilizando-se a fração antigênica insolúvel de *Leishmania (Viannia) braziliensis*”.

Eu,, concordo que meu(minha) filho(a) 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 meu(minha) filho(a) faz parte do grupo de pacientes, será submetido(a) ao teste de Montenegro, que é uma injeção sob a pele e que poderá causar ou não, após dois dias, o aparecimento de um “caroço” no local. Passará também por exames como pesquisa direta, punção aspirativa e biópsia da borda da lesão, cuja coleta do material para realizá-los pode causar um pouco de dor ou desconforto. Por fim, será então submetido(a) a coleta de sangue venoso em volume equivalente a quatro colheres de sopa, antes e após tratamento quimioterápico ou após cura clínica espontânea. 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. Vale ressaltar que todas as informações e os detalhes dos exames que serão realizados serão esclarecidos para mim e meu filho(a).

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 da participação de meu(minha) filho(a) 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 identidade de meu (minha) filho(a). 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 menor de 18 anos

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) 2101 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

APÊNDICE C – TCLE Grupo Controle
Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle

Projeto: “Avaliação da produção *in vitro* de citocinas e de óxido nítrico na leishmaniose tegumentar americana ativa e após cura clínica, utilizando-se a fração antigênica insolúvel de *Leishmania (Viannia) braziliensis*”.

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 coleta de sangue venoso em volume equivalente a quatro colheres de sopa. 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. Vale ressaltar que todas as informações e os detalhes do procedimento serão esclarecidos para mim.

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) 2101 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.

ANEXO A – Parecer CEP/CPqAM

Título do Projeto: Avaliação da produção *in vitro* de citocinas e de óxido nítrico na leishmaniose tegumentar americana ativa e após cura clínica, utilizando-se a fração antigênica insolúvel de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Pesquisador responsável: Marina de Assis Souza

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 17/09/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 123/08

Registro no CAAE: 0122.0.095.000-08

PARECER Nº 107/2008

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 e este parecer tem validade até 06 de novembro de 2011. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 06 de novembro de 2008.


Dr. Zilma Maria de Medeiros
Bióloga Médica
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:**Anexos:**

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 06/11/2009.

Campus de UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2899
Recife - PE - Brasil
comiteetetica@cpqam.fiocruz.br



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)