



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**

**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERÍSTICAS DA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES COM  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, ANTES E APÓS  
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO COM ANTIMONIAL  
PENTAVALENTE**

**THAÍS TIBERY ESPIR**

**Manaus**

**2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THAIS TIBERY ESPIR

CARACTERÍSTICAS DA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA, ANTES E APÓS TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO  
COM ANTIMONIAL PENTAVALENTE.

Tese apresentada ao Programa Multi-  
institucional de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal do  
Amazonas, como requisito final para a  
obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia, área de concentração Saúde.

Orientação: Dr<sup>a</sup>. Antonia Maria Ramos Franco

Co-orientação: Dr<sup>a</sup> Adriana Malheiro

Manaus

2013

**FICHA CATALOGRÁFICA**

E77c Espir, Thais Tibery  
Características da resposta imune em pacientes com leishmaniose tegumentar americana, antes e após tratamento quimioterápico com antimonial pentavalente / Thais Tibery Espir. - Manaus: UFAM, 2013.  
180 f.; il. color.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas.  
Orientadora: Dr<sup>a</sup> Antonia Maria Ramos Franco  
Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Adriana Malheiro

1. Leishmaniose – Tratamento 2. Marcadores celulares I. Franco, Antonia Maria Ramos (Orient.) II. Malheiro, Adriana (Orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título  
CDU (2007): 616.993.161(043.2)

**Sinopse:**

A Região Norte possui a maior incidência de leishmaniose do país, sendo a espécie *Leishmania (Viannia) guyanensis* responsável pelo maior número de casos. Suas diferentes formas clínicas constituem um grave problema de saúde pública. As manifestações clínicas estão relacionadas às distintas espécies de *Leishmania* e à resposta imune do hospedeiro. A leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* diferenciam-se das outras espécies nos aspectos da infecção clínica, diagnóstico e terapêutica. Neste estudo sugere-se a participação de diferentes linhagens celulares envolvidas na resposta à infecção além da detecção e identificação das imunoglobulinas e concentração das citocinas no soro de indivíduos infectados principalmente com *Leishmania (Viannia) guyanensis*, antes e após o tratamento com antimonial pentavalente.

Palavras-chave: Leishmaniose – tratamento – marcadores celulares.

## DEDICATÓRIA

*“Dedico este trabalho aos grandes e verdadeiros amores da minha vida: minhas filhas, **Lais e Marina**; meu marido, **Jorge**; minha mãe, **Lilian**; e minha avó, **Lya**”.*

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus pelo dom da vida e por sempre colocar pessoas tão especiais no meu caminho!
- Aos pacientes que colaboraram com a tese;
- À querida Dr<sup>a</sup> Antonia Franco pelo exemplo de simplicidade, humildade e respeito ao próximo. O maior presente que recebi, nestes quatro anos de caminhada, foi à oportunidade de conviver com alguém tão especial. Obrigada por me ensinar os caminhos da pesquisa com *Leishmania*. Você sempre estará no meu coração!
- À Dr<sup>a</sup> Adriana Malheiro e toda equipe da Fundação HEMOAM, especialmente os queridos amigos, Allyson Guimarães, João Paulo Pimentel e Adélia Figueiredo, pela gentileza com que me acolherem em seu laboratório e pela imprescindível colaboração na realização dos testes imunológicos;
- Ao Jorge Augusto pelo amor, paciência, ajuda e dedicação durante todos esses anos. Você é meu companheiro da vida! As minhas queridas filhas, Laís e Marina, pela compreensão da minha ausência nos momentos difíceis, vocês são a razão da minha vida. Amo vocês imensamente!
- À minha amada mãe, exemplo de dedicação à família, de força e de coragem! Obrigada pelo amor incondicional! Obrigada pelo esforço na minha educação e pelo carinho. Não há palavra alguma que expresse a minha tamanha gratidão e amor por você;
- Ao meu pai, *in memorium*, amado e querido que se foi de forma abrupta e sempre estará nas minhas melhores lembranças. Queria poder parar o tempo, eternizar sua voz, seus conselhos e conversar com você sobre ciência e tudo mais, todos os segundos da minha vida;
- Aos meus avós, Lya e Hécio (*in memorium*), pelo exemplo de vida e retidão de caráter!
- Ao Alessandro pelos ensinamentos e conselhos dados em todos os momentos da minha vida. Tenho imensa admiração por você!
- As minhas irmãs, Raquel, Alice, Clara pela força e pelas horas de carinho. Sinto muitas saudades de vocês três! Ao Eduardo e Beatriz irmãos queridos que estarão sempre em meu coração;
- As queridas tias Ketrin e Esmeralda (*in memorian*) por sempre acreditarem no meu potencial;

- A minha irmã de coração Aline Brito que trouxe tanta felicidade para minha família, pelo carinho e pelo exemplo de bondade e generosidade;
- A professora Maricleide Naiffi pelo carinho, pela força, pela amizade, pelos conselhos e pelo exemplo de simplicidade e espontaneidade. Você é um anjo que veio iluminar nossas vidas!
- Ao Dr. Marcelo Ortigão pela constante disponibilidade e discussão dos trabalhos e dos testes estatísticos;
- A toda equipe do município de Rio Preto da Eva-AM, especialmente ao técnico Antônio José pela busca dos pacientes;
- As minhas amigas Luanda Figueira e Thayanne Sá pela ajuda, amizade e companheirismo especialmente na fase final da Tese;
- Aos meus amigos do INPA, Dr<sup>a</sup> Liliane, Dr<sup>a</sup> Sônia, Dr<sup>a</sup> Francimeire, Dr. Luís, Dr<sup>a</sup> Flávia, Lourival, Artêmio, Cândido, Paulo Edson, Ana Cleide, Glenda, Elaine, Jéssica, Carlinhos, Ivonei, Cláudia, Fabiane, Susi, Alana, Renata pelo apoio na execução deste trabalho;
- À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade desta Pós-Graduação;
- Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM pela minha formação;
- Ao Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas pelo apoio logístico;
- A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

***Muito obrigada!***

## **FINANCIADORES**

Este trabalho foi parcialmente financiado por recursos da Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), através do programa 007/2009-PPSUS e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do fornecimento de bolsa de estudo.

## RESUMO

O processo de instalação da leishmaniose no hospedeiro é determinado por uma complexa associação entre fatores relacionados à virulência do parasito e a resposta imune do hospedeiro. Fatores como a espécie parasitária, sua virulência e tropismo, além da condição genética e imunológica do hospedeiro desencadeiam diferentes formas clínicas na Leishmaniose tegumentar Americana (LTA). Em decorrência disso, é de suma importância compreender os mecanismos da resposta imune contra o protozoário, os tipos celulares, as citocinas e o perfil da resposta envolvida nesse processo, uma vez que, esses fatores podem conferir certa resistência ao parasito e/ou impedir o desenvolvimento de nova infecção. Foram avaliados 33 pacientes com LTA, causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (Leishmania) amazonensis*. A espécie predominante encontrada foi *L. (V.) guyanensis* representando 73% dos casos. A análise comparativa do perfil celular e das citocinas avaliadas pelas técnicas da Citometria de fluxo e ELISA nos pacientes infectados foi significativamente maior do que nos indivíduos sem infecção (controle). Aparentemente, a infecção causada por *L. (V.) guyanensis*, induz maior concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e INF- $\gamma$ ) do que infecção causada por *L. (L.) amazonensis*, o mesmo não foi observado na infecção por *L. (V.) naiffi*. Verificou-se variação na concentração das citocinas e no percentual celular nas amostras dos pacientes infectados antes do início do tratamento com antimonial pentavalente quando comparado ao grupo controle e ao término do tratamento. O percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> antes do tratamento foi maior do que linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Menor porcentagem de células T regulatórias foi observada antes do tratamento. Esses resultados indicam que existe influência da resposta imune na modulação da infecção por *Leishmania* e que infecções causadas por *L. (V.) guyanensis* apresentam resposta mais exacerbada do que a infecção causada pelas outras espécies aqui estudadas.

Descritores: Leishmaniose, Tratamento, Marcadores Celulares.

## ABSTRACT

The installation process of leishmaniasis in the host is determined by a complex association between factors related to virulence of the parasite and the host immune response. Factors such as parasite species, its virulence and tropism, besides the genetic condition and host immune trigger different clinical forms in American cutaneous leishmaniasis (ACL). As a result, it is of paramount importance to understand the mechanisms of the immune response against the parasite, cell types, cytokines and response profile involved in this process, since these factors may confer some resistance to the parasite and/or prevent the development reinfection. 33 patients with ACL caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* and *L. (Leishmania) amazonensis*. The predominant species found was *L. (V.) guyanensis* representing 73% of cases. The comparative analysis of the cellular and cytokine profile evaluated by the techniques of flow cytometry and ELISA in infected patients was significantly higher than in individuals without infection (control). Apparently, the infection caused by *L. (V.) guyanensis* induces a higher concentration of pro-inflammatory cytokines (IL-2 and INF- $\gamma$ ) than infection caused by *L. (L.) amazonensis*, what was not observed in infection by *L. (V.) naiffi*. There was variation in the concentration of cytokines and cell percentage in samples from infected patients before initiating treatment with pentavalent antimony compared to the control group and after treatment. The percentage of CD4<sup>+</sup> T cells prior to treatment was greater than CD8<sup>+</sup> T cells. Lower percentage of regulatory T cells was observed before treatment. These results indicate that there is influence of immune response modulation on *Leishmania* infection and infections caused by *L. (V.) guyanensis* have exacerbated the response to infection caused by the other species studied here.

Key words: Leishmaniasis, Tratament, Cell Markers.

## SUMÁRIO

	pág.
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. As leishmanioses: aspectos gerais.....	05
1.2. As leishmanias.....	08
1.3. Interação <i>Leishmania</i> -Vetor e Ciclo biológico.....	10
1.4. Patogênese e Manifestações clínicas.....	12
1.5. As espécies de leishmanias na Amazônia brasileira.....	16
1.6. Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana.....	18
1.7. Diagnóstico laboratorial.....	30
1.8. Tratamento.....	32
1.8.1 Antimonial pentavalente.....	32
1.8.2. Outros medicamentos.....	35
2. OBJETIVOS.....	37
2.1- Geral.....	37
2.2- Específico.....	37
CAPÍTULO I.....	38
CAPÍTULO II.....	101
3. DISCUSSÃO GERAL.....	134
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	143
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145
6. ANEXOS.....	167

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO I</b>	<b>Pág.</b>
Tabela 01. Marcação dos anticorpos Monoclonais.....	52
Tabela 02. Dados clinico-epidemiológicos de pacientes infectados por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> na Unidade Mista de Saúde Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão, Rio Preto da Eva/AM.....	57
Tabela 03. Resultados de IDRMs e Imunoglobulinas em pacientes com LTA antes e pós-tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®).....	59
Tabela 04. Tabela 04. Resultado referente à positividade dos métodos de diagnóstico utilizados.....	62
Tabela 05. Perfil da Resposta Imune de pacientes com <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> .....	75
<b>CAPÍTULO II</b>	
Tabela 1. Dados clinico-epidemiológicos de pacientes com leishmaniose tegumentar na Unidade Mista de Saúde Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão, Rio Preto da Eva/AM.....	112

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

	Pág
Figura 01. Formas evolutivas da <i>Leishmania</i> .....	09
Figura 02. Esquema do ciclo de vida de leishmania sp. dentro do flebotomíneo....	11
Figura 03. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp.....	13
Figura 04. Apresentação do parasito frente à Resposta Imune do hospedeiro.....	20
Figura 05. Produção de citocinas pelos macrófagos, células dendríticas, células T e B determinam o desenvolvimento da infecção pela <i>Leishmania</i> .....	22

### CAPÍTULO I

Figura 01. Mapa com a localização do município de Rio Preto da Eva- Amazonas-Brasil.....	46
Figura 2. Fluxograma de atendimento dos pacientes.....	47
Figura 3. Características clínicas (forma cutânea) da leishmaniose tegumentar em Rio Preto da Eva/AM.....	58
Figura 4. Reatividade de IgG e IgM em amostras do soro de pacientes com Leishmaniose cutânea causada por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> e população não infectada.....	60
Figura 5. Reatividade de IgG e IgM em amostras do soro de pacientes com Leishmaniose cutânea causada por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> antes do tratamento (AT) e pós-tratamento (PT) com antimonial pentavalente.....	61
Figura 6. Reatividade de IgG e IgM nas amostras antes do início do tratamento para Leishmaniose Tegumentar Americana.....	62
Figura 7. Identificação dos Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , Linfócito B (CD19 <sup>+</sup> ) e B1 (CD5 <sup>+</sup> /CD19 <sup>+</sup> ) utilizando o programa <i>FlowJo</i> (v9.4).....	63
Figura 8. Porcentagem de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> ; CD4 <sup>+</sup> e linfócitos B (CD19 <sup>+</sup> ) e B1(CD5 <sup>+</sup> /CD19 <sup>+</sup> ) em amostra de sangue periférico de pacientes com infecção por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> e população sem infecção.....	65
Figura 9. Identificação dos Linfócitos Treg (CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /FoxP3 <sup>+</sup> ) utilizando o programa <i>FlowJo</i> (v9.4).....	66

Figura 10. Porcentagem de linfócitos T regulatórios (CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /FoxP3 <sup>+</sup> ) em amostra de sangue periférico de pacientes com infecção por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> e população sem infecção.....	67
Figura 11. Identificação das Células NK (CD3 <sup>-</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> ) e NKT (CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> ) utilizando o programa <i>FlowJo</i> (v9.4).....	68
Figura 12. Porcentagem de células NK (CD3 <sup>-</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> ) e NKT (CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> ) em amostra de sangue periférico de pacientes com infecção por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> e população sem infecção.....	69
Figura 13. Identificação dos Monócitos (CD14 <sup>+</sup> ) e Monócitos Ativados (CD14 <sup>+</sup> /CD80 <sup>+</sup> ) utilizando o programa <i>FlowJo</i> (v9.4).....	70
Figura 14. Porcentagem Monócitos (CD14 <sup>+</sup> ) e Monócitos Ativados (CD14 <sup>+</sup> /CD80 <sup>+</sup> ) em amostra de sangue periférico de pacientes com infecção por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> e população sem infecção.....	71
Figura 15. Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e de perfil T <sub>H</sub> 1 (INF- $\gamma$ , IL1-2, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-8) em amostras do soro de pacientes com Leishmaniose cutânea causada por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> e população sem infecção (CN).....	72
Figura 16: Níveis séricos de citocinas regulatórias e de perfil T <sub>H</sub> 2 e T <sub>H</sub> 17 (IL-10, IL-4, IL-5, IL-17) em amostras do soro de pacientes com LTA causada por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> e população sem infecção (CN).....	74

## CAPÍTULO II

Figura 01. Lesões cutâneas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva. Lesões de pacientes infectados por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> , <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i> .....	111
Figura 02. Concentrações séricas de citocinas (IL-2, TNF- $\alpha$ e INF- $\gamma$ ) em amostras do soro de pacientes infectados por <i>Leishmania</i> e indivíduos não infectados (grupo controle).....	114
Figura 03. Concentrações séricas de citocinas (IL-10, IL-4, IL-6 e IL-17) em amostras do soro de pacientes infectados por <i>Leishmania</i> e população sem infecção (controles).....	116
Figura 04. Concentrações séricas de citocinas (IL-2, TNF- $\alpha$ e INF- $\gamma$ ) em amostras do soro de pacientes com segunda infecção por <i>Leishmania</i> e indivíduos sem infecção (controles).....	117

Figura 05. Concentrações séricas de citocinas (IL-10, IL-4, IL-6 e IL-17) em amostras do soro de pacientes com segunda infecção por <i>Leishmania</i> e indivíduos sem infecção (controles).....	118
Figura 06. Concentrações séricas de citocinas (IL-2, TNF- $\alpha$ e INF- $\gamma$ ) em amostras do soro de pacientes primo-infectados e com segunda infecção por <i>Leishmania</i> e indivíduos sem infecção (controles).....	119
Figura 07. Concentrações séricas de citocinas (IL-10, IL-4, IL-6 e IL-17) em amostras do soro de pacientes primo-infectados e com segunda infecção por <i>Leishmania</i> e indivíduos sem infecção (controles).....	120

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CBA	<i>Cytometric beads array</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos
CN	Controle Negativo
CR3	Receptor do complemento 3
CR5	Receptor do complemento 5
CR9	Receptor do complemento 9
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DC	Células dendríticas
ELISA	Ensaio imunoenzimático ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> )
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
gp63	glicoproteínas de 63 kDa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HEMOAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV-I/II	Vírus T-linfotrópicos tipo I e tipo II
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
kDa	Quilodalton
LACEN/AM	Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas
LC	Leishmaniose cutânea
LCAD	Leishmaniose cutânea anérgica difusa
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCDB	Leishmaniose cutânea disseminada “bordeline”
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LRV1	<i>Leishmania</i> RNA vírus 1
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
MP	Matriz peritrófica
MS	Ministério da Saúde

NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NK	Células <i>natural-killer</i>
NKT	Células <i>natural killer</i> regulatórias
NMG	Antimoniato de N-metilglucamina
NNN	Neal, Novy & Nicolle
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
pg/ml	Picograma por mililitro
RAG-/-	Recombination Activating Gene
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotação por minuto
Sb III	Antimonial trivalente
Sb V	Antimonial pentavalente
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SBF	Soro Bovino Fetal
SINAN	Sistema Nacional de Agravos
TA	Temperatura ambiente
CD3 <sup>+</sup>	Marcador de Linfócito T CD3
CD4 <sup>+</sup>	Marcador de Linfócito T CD4
CD5 <sup>+</sup>	Marcador de Linfócito B CD5
CD5 <sup>+</sup> /CD19 <sup>+</sup>	Marcador de Linfócito B1 CD5/CD19
CD8 <sup>+</sup>	Marcador de Linfócito T CD8
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /FoxP3 <sup>+</sup>	Marcador de Linfócitos T regulatórios
CD3 <sup>-</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	Marcador de células <i>Natural Killers</i>
CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	Marcador de células <i>Natural Killers</i> do tipo T
CD14 <sup>+</sup>	Marcador de Monócitos
CD14 <sup>+</sup> /CD80 <sup>+</sup>	Marcador de Monócitos Ativados
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator beta de crescimento e transformação
T <sub>H</sub> 1	Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 1
T <sub>H</sub> 2	Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 2
T <sub>H</sub> 17	Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 17
TLR2	Toll-like <i>receptor 2</i>
TLR3	Toll-like <i>receptor 3</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alpha
WHO	World Health Organization

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose compreende um grupo de doenças crônicas infecto-parasitárias de apresentação heterogênea, variando desde lesões de pele com evolução autolimitada até a forma visceral fatal (MURRAY et al., 2005). É causada por diferentes protozoários do gênero *Leishmania*, que pertencem à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae, acometendo hospedeiros mamíferos, tais como o homem que vem a ser um hospedeiro acidental (SIMPSON, 1987; GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007).

A leishmaniose está entre as dezessete doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e ocupa a categoria de doenças emergentes e sem controle (LINDOSO; LINDOSO, 2009; ALVAR et al., 2012), estando presente em 98 países ou territórios (OMS 2010; ALVAR et al., 2012). Mais de 350 milhões de pessoas estão em áreas de risco e, a cada ano, 500 mil desenvolvem a forma visceral e 1,5 milhões a forma tegumentar da doença (DESJEUX, 2004; WHO, 2010; ALVAR et al., 2012). Fatores como mudanças ambientais, migrações descontroladas, turismo ecológico, trabalho em áreas de risco, dificuldades de tratamento, hospedeiros imunocomprometidos e migração de pessoas não imunes para áreas endêmicas contribuem para o aumento do número de casos (DESJEUX, 2001; SHAW, 2007).

No Brasil, a Leishmaniose tegumentar americana (LTA) destaca-se por sua ampla distribuição, ocorrendo em todos os Estados da Federação. O Estado do Amazonas notificou 2230 novos casos da doença somente no ano de 2011 e a transmissão ocorreu principalmente nos municípios de Manaus (752 casos), Presidente Figueiredo (213 casos) e Rio Preto da Eva (203 casos) [SINAN/SVS/MS, 2012].

Na Amazônia, a LTA é causada por sete espécies de leishmanias, seis do subgênero *Viannia*, incluindo *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis* (SILVEIRA, 2002; 2004). A *L.(V.) guyanensis* é a espécie prevalente no Amazonas, contribuindo com mais de 80% dos casos (NAIFF, 1999; FIGUEIRA et al., 2008; GUERRAa et al.,2011).

Em função da diversidade e complexidade biológica do parasito, dos vetores e da resposta imune celular do hospedeiro na LTA, diferentes formas clínicas podem se desenvolver convencionalmente conhecidas como: forma mucocutânea (LMC) que pode causar mutilações, a cutânea anérgica difusa (LCAD) que é de longa duração devido à resposta imune mediada por células deficientes, e a forma cutânea (LC), quando em múltiplas lesões, pode ser incapacitante (DESJEUX, 2004; SILVEIRA, 2004). A forma leishmaniose cutânea disseminada “borderline” (LCDB) foi proposta como sendo intermediária entre LC e os polos extremos patogênicos LMC e LCAD (SILVEIRA et al., 2004; 2009).

O diagnóstico clínico da doença baseia-se nas características das lesões cutâneas, muitas das quais são similares nas várias formas da LTA, ou mesmo confundidas com outras enfermidades (SILVEIRA et al., 2009).

A OMS e o Ministério da Saúde do Brasil recomendam os antimoniais pentavalentes como drogas de primeira escolha para o tratamento da LTA. Entretanto, a resposta ao antimonial em pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis*, tem se demonstrado precária e algumas vezes ineficiente (ROMERO, 2001; NEVES et al., 2011). Uma grande dificuldade para o sucesso do tratamento em pacientes infectados em diferentes regiões do Amazonas se dá por sua ocorrência ser em áreas rurais longínquas, de difícil acesso ao serviço de saúde e a necessidade exclusiva de terapêutica parenteral (GUERRAa et al., 2011). As variações da eficácia terapêutica dos antimoniais pentavalentes na LTA podem ser devido a diferentes

esquemas posológicos utilizados em diversas regiões geográficas, à espécie e cepa do parasito infectante, à imunidade do hospedeiro e à forma clínica da doença (AREVALO et al., 2007; SILVEIRA, 2009; NEVES; CALDAS; SAMPAIO, 2009; GUERRA et al., 2011; PIMENTEL et al., 2011).

De modo geral, as leishmanias são transmitidas a hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas, cujos principais gêneros são: *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). As formas promastigotas metacíclicas presentes no tubo digestivo do vetor são inoculadas durante a picada juntamente com a saliva do inseto (BALANÃ-FOUCE et al. 1998; GONTIJO; CARVALHO; 2003). A saliva tem um papel significativo no processo de transmissão do parasito e também no desenvolvimento da lesão. Possui substâncias imunogênicas com atividades farmacológicas, tais como vasodilatadoras, anti-agregadoras de plaquetas, anti-hemostáticas, e imunossupressoras, que são capazes de exacerbar a infecção (KAMHAWI, 2000; SOARES; TURCO, 2003; MARZOUCKI et al., 2012).

Logo após o repasto sanguíneo do vetor no hospedeiro, as promastigotas metacíclicas encontram um ambiente constituído por componentes do sangue (células e plasma) extravasados para o tecido. Peters et al. (2008) demonstraram um papel fundamental desempenhado pelos neutrófilos, no processo natural de transmissão dos parasitos via picada, estes nos quais são rapidamente atraídos para o sítio de inoculação fagocitando os parasitos.

Posteriormente, neutrófilos infectados são também fagocitados por macrófagos, que acabam sendo ectados e colonizados de uma maneira silenciosa sem que sejam ativados. Esta forma de invasão já foi denominada “Cavalo de Tróia” (VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; VAN ZANDBERGEN et al., 2004; LASKAY; PETERS; SACKS, 2009; CHARMOY et al., 2010).

Já foi demonstrado também que *Leishmania* é capaz de direcionar a diferenciação de células T para um perfil de resposta imune, podendo levar à cura ou persistência do parasito (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; REIS et al., 2006). A função dos linfócitos T com fenótipo CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2) é importante na instalação da doença. Os linfócitos T<sub>H</sub>1 produzem interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL-2, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e TNF, que levam a ativação de macrófagos e a destruição dos parasitos. Por outro lado citocina regulatória como IL-10 e de perfil T<sub>H</sub>2 como IL-4, IL-5, parecem inibir a ativação dos macrófagos e levam a ativação de linfócitos B (COUTINHO et al., 1996; LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008).

Para alguns autores a infecção por *L. (V.) guyanensis* parece induzir uma resposta imune menos exacerbada quando comparada com a *L. (V.) braziliensis*, espécie no Brasil que apresenta o modelo de resposta imune mais bem estudado. Esta descoberta poderia explicar alguns aspectos de apresentação clínica da *L. (V.) guyanensis*, tais como, alta carga parasitária no tecido e resistência à terapia (GRIMALDI, 2008; MATTA et al., 2009).

Para entender melhor as diferentes patogenias causadas por parasitos, vários estudos envolvendo a interação parasita-célula hospedeira têm sido desenvolvidos.

Brito et al. (2001) através de ensaios de ELISA, IFI e Western blot, utilizando-se frações antigênicas solúveis de *L. (V.) braziliensis*, observaram uma diminuição na reatividade aos anticorpos quando se comparou soros de pacientes com LTA ativa e após tratamento específico. Inclusive, resultado similar foi observado em indivíduos com cura espontânea, sugerindo que esses antígenos podem ser usados como marcadores de cura. Frente a esses resultados e para melhor compreender os aspectos imunológicos da LTA em nossa região, Reis (2007) avaliou a resposta linfoproliferativa e o envolvimento das citocinas dos pacientes com LTA, antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico, pela estimulação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com a fração antigênica

solúvel de *L. (V.) braziliensis*. Neste estudo avaliou-se a resposta linfoproliferativa e identificou-se a produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em PBMC de 15 pacientes com LTA antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico com Glucantime e de 10 indivíduos saudáveis (controles). Os pacientes apresentaram elevada resposta proliferativa antes e após tratamento, embora sem diferença estatística ao comparar esses dois momentos. A análise na produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 identificou diferença significativa ao comparar o grupo de pacientes em relação ao controle. Após tratamento quimioterápico, embora sem diferença estatística, a dosagem dos sobrenadantes dos pacientes revelou diminuição nos níveis de IFN- $\gamma$  e aumento de IL-10. Estes resultados indicam que os pacientes produziram uma resposta celular específica à fração antigênica solúvel de *L. (V.) braziliensis*, sugerindo que mecanismos de regulação imunológica com a participação de células T de memória e células T regulatórias, além da dicotomia T<sub>H1</sub> x T<sub>H2</sub> estão presentes na evolução clínica de indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis*.

Existe, portanto, urgência na melhor compreensão dos mecanismos da infecção e do funcionamento do sistema imunológico do hospedeiro, especialmente nas regiões onde ocorrem diferentes espécies do parasito circulantes e vasta apresentação clínica da doença.

Essa tese está dividida em dois capítulos que abordam aspectos da resposta imune da LTA causada por diferentes espécies circulantes no Amazonas.

### 1.1- As Leishmanioses: aspectos gerais

As leishmanioses são doenças parasitárias que constituem grave problema de saúde pública. Distribuídas nos cinco continentes, ocorrem em 98 países onde anualmente são registrados 220.000 casos de Leishmaniose cutânea (LC) e 58.000 de Leishmaniose visceral (LV), mas somente em dois terços dos países a notificação é compulsória, sendo o número de

casos subestimados. Por estimativa, calcula-se que o número real de casos seja de aproximadamente 700.000 a 1200.000 para LC e de 200.000 a 400.000 para LV (WHO, 2010; ALVAR et al., 2012). Cerca de 90% dos casos de LTA ocorrem no: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. No continente americano, as formas clínicas da doença são conhecidas como leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) [WHO, 2010; ALVAR et al., 2012].

As manifestações clínicas da LTA podem variar desde infecções assintomáticas a apresentações de lesões cutâneas simples, úlceras mucocutâneas mutilantes até as formas difusa e disseminada (SILVEIRA 2004; 2009). As formas de LVA podem ser assintomática, oligossintomática ou clássica, com importante hepatoesplenomegalia, frequentemente levando o indivíduo à morte quando não tratado (BADARÓ et al., 1986). Esse amplo espectro de manifestações clínicas é consequência da complexa interação do parasito/hospedeiro (GRIMALDI; TESH, 1993).

Os parasitos são transmitidos aos hospedeiros mamíferos, inclusive o homem, pela picada de insetos, que se alimentaram previamente em um reservatório infectado (RYAN et al., 1987). Os insetos são fêmeas hematófagas de diversas espécies conhecidas genericamente como flebotomíneos, da Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, subgêneros *Nyssomyia*, *Psychodopygus* e diferentes gêneros (*Psychodopygus*, *Lutzomyia*). Nas Américas, existem aproximadamente 30 espécies de *Lutzomyia* com comprovada capacidade de transmitir *Leishmania* (RANGEL; LAINSON; 2009).

Nas últimas décadas, houve um aumento no número de casos de todas as formas clínicas da doença associado à expansão geográfica e a coinfeção *Leishmania*/HIV. Essa associação é considerada emergente em várias regiões do mundo em função da superposição geográfica das duas infecções, como consequência da urbanização das leishmanioses e da

interiorização da infecção pelo HIV (ALVAR; DESJEUX, 2003; RABELLO; ORSINI; DISCH, 2003; GUERRAa et al., 2011).

No Novo Mundo, existem evidências de que a LTA já ocorria no continente antes mesmo da chegada dos colonizadores. A leishmaniose tegumentar foi documentada na América desde 400-900 D.C., em cerâmicas pré-colombianas feitas pelos índios do Peru, apresentando mutilações de lábios e narizes e os conquistadores espanhóis também relataram a ocorrência da doença na população que habitava o continente (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987).

A indicação mais antiga e segura da existência da LTA no Brasil consta em citação na tese de Tello, "Antigüedad de la syphilis en el Peru", de 1908, relativa a obra escrita Pastoral Religioso-Político Geographico, editada em 1827, que descreve a viagem de um missionário pela região amazônica, na qual foi observada a existência de indivíduos com úlceras nos braços e pernas, relacionadas a picadas de insetos, tendo como consequência lesões destrutivas de boca e nariz (FURTADO; VALE, 2005).

Em 1925, Eduardo Rabello publicou o trabalho "Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil" onde concluiu que a LTA existia no país desde muitos anos e distingue três períodos na história da doença: "o período das origens imprecisas" baseado em referências mais ou menos vagas, culminando com a data da verificação clínica do botão da Bahia e sua filiação ao botão endêmico dos países quentes; "o segundo período" que vai desde os estudos baianos feitos entre 1895 e 1909 quando foi descoberto o agente etiológico responsável pelas úlceras de Baurú, podendo ser chamado período pré-microbiológico; e "o terceiro período" chamado microbiológico, iniciado em 1910 com verificação do parasito em lesões de mucosas, com a descoberta da quimioterapia por Gaspar Vianna e o reconhecimento dos aspectos epidemiológicos desta moléstia (COSTA, 1992).

De acordo com Rangel e Lainson (2009), se considerarmos o impressionante número de espécies de *Leishmania* que foram registradas até o presente momento na região neotropical, e, particularmente, na região Amazônica, esta área poderia muito bem ser tida como o local de origem deste gênero. Esta hipótese é corroborada pela observação de que muitos destes parasitos (espécies do subgênero *Viannia*) mantiveram o seu desenvolvimento no intestino posterior no hospedeiro flebotomíneo, o que seria remanescente do ciclo de vida de flagelados monóxenos de insetos dos quais as espécies de *Leishmania* teriam evoluído.

Atualmente há registros de casos da LTA em todos os estados da Federação (BRASIL, 2010). Surtos epidêmicos são identificados nas regiões Sudeste, Centro- Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica, relacionados ao processo de exploração e colonização dessa região, acometendo frequentemente os trabalhadores que invadem as florestas tropicais ou moram próximo a elas (BRASIL, 2002; 2007; 2011). O ciclo, inicialmente silvestre e rural, já se encontra presente em grandes cidades, como resultado da adaptação de vetores e reservatórios ao ambiente urbano, processo este conhecido como a urbanização das leishmanioses no Novo Mundo (SILVA et al., 2005). No Brasil, no período de 1988 a 2009, a LTA apresentou uma média anual de 27.093 casos notificados. No Amazonas, a região metropolitana de Manaus concentra o maior número de casos da doença, com ocorrência em média de 600 casos/ano (BRASIL, 2007; 2011).

## 1.2- As leishmanias

Os parasitos do gênero *Leishmania* são flagelados da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, filo Protozoa. Possuem ciclo de vida heteroxênico, alternando estágios de vida entre hospedeiros mamíferos e invertebrados (BATES, 2007; SIMPSON, 1987).

A multiplicação ocorre por divisão binária e clonal. Apresentam grande diversidade biológica dentro do mesmo gênero devido a mutações e/ ou trocas genéticas entre os organismos, através de fusão celular (SOUZA et al., 1997). Reprodução sexual no interior do vetor e transmissão de parasitos híbridos ao hospedeiro mamífero já foram descritos (AKOPYANTS et al., 2009). Entretanto, evidências desse tipo de reprodução e transmissão, não se sabem ao certo com qual frequência podem ocorrer (TIBAYRENC; KJELLBERG; AYALA, 1990; CUPOLLILO; GRIMALDI; MOMEN, 1994; CUPOLLILO et al., 1998; BAÑULS et al., 1999).

Apresentam duas formas principais em seu ciclo biológico: as promastigotas (10-20 $\mu$ m) que são formas extracelulares, alongadas e móveis, com cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre a partir da porção anterior da célula encontradas no tubo digestivo dos insetos vetores e as formas amastigotas (3-7 $\mu$ m), que são obrigatoriamente intracelulares, com flagelo curto interiorizado, imóveis e que são encontradas no interior das células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado, incluindo uma variedade de mamíferos (roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados e primatas) [Figura 01].

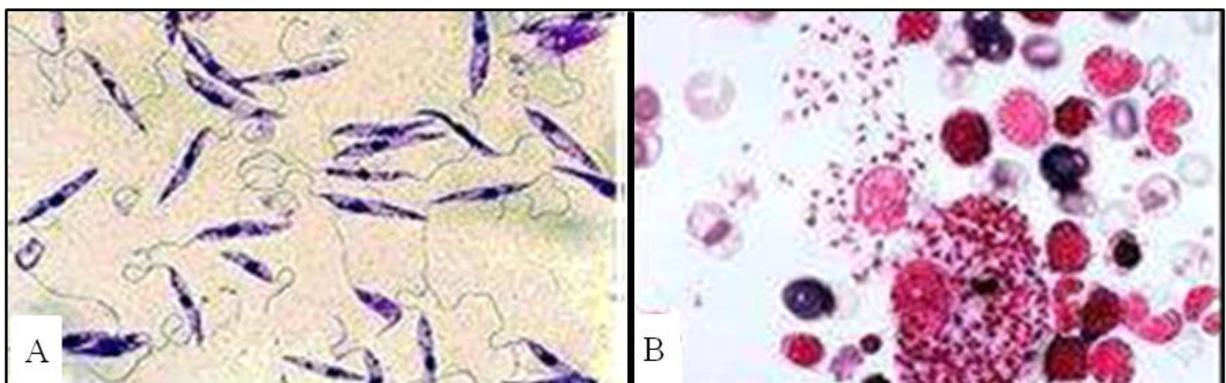


Figura 01. (A): formas promastigotas e (B): formas amastigotas da *Leishmania* no interior dos macrófagos (Fonte: CARVALHO; CARVALHO, 2003).

### 1.3- Interação *Leishmania*-Vetor e Ciclo biológico

Flebotomíneos são considerados telmatofágicos ou “pool-feeding” (RIBEIRO, 1987), e para obter sangue produzem a dilaceração do tecido e de microcapilares. O processo de interação vetor-parasito se inicia quando uma fêmea de flebotomíneo se alimenta de sangue em um hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo macrófagos contendo a forma amastigota da *Leishmania*.

Para sobreviver e estabelecer uma infecção de sucesso nos flebotomíneos, o parasito precisa vencer diversas barreiras (SACKS, KAMHAWI, 2001), tais como: sobreviver dentro do ambiente inóspito do tubo digestivo na presença de enzimas digestivas, escapar do espaço endoperitrófico, se ligar e desligar do epitélio do tubo digestivo, e por fim migração para a porção anterior do tubo digestivo.

A ingestão de sangue induz a síntese e secreção de enzimas digestivas no lúmen do intestino médio do inseto (tais como tripsina, quimiotripsina, aminopeptidases, carboxipeptidases e glicosidades) além, da formação da matriz peritrófica (MP). Os macrófagos se rompem liberando as amastigotas que evoluem para a fase promastigota; os parasitos (nectomonas) devem escapar do espaço endoperitrófico e se ligarem ao endotélio do intestino médio (SCHLEIN; JACOBSON; MESSER, 1992; DILLON; LANE, 1993; BOULANGER et al., 2004; RAMALHO-ORTIGÃO; SARAIVA; TRAUB-CSEKÖ, 2010).

Em seguida, passam por um processo denominado metaciclogênese, no qual ocorre uma transformação bioquímica no tamanho das porções glicídicas das moléculas de lipofosfoglicano (LPG) ancoradas nas membranas das promastigotas, se desenvolvendo então em promastigotas metacíclicos (forma infectiva ao hospedeiro vertebrado) e migram em direção a região da válvula estomodeal ou cárdia. Na cárdia, tem sido mostrado que o parasito secreta quitinase, que danifica a válvula estomodeal, impedindo que a mesma exerça sua

função normal, forçando assim, o flebotomíneo a regurgitar o conteúdo existente no estômago enquanto realiza seu repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRICK; RIOUX, 1991; ROHOUSOVÁ; VOLP, 2006; POINAR 2007).

É amplamente aceito que a principal forma de transmissão da *Leishmania* é através da regurgitação do vetor na pele do hospedeiro vertebrado (RAMALHO-ORTIGÃO; SARAIVA; TRAUB-CSEKÖ, 2010) [Figura. 02]. Nessa ocasião, acredita-se que a maioria dos parasitos são eliminados pela ação lítica do sistema complemento e pela ação dos neutrófilos e eosinófilos presentes no sangue que fluem para o local da pele lacerada pela probóscida do inseto vetor.

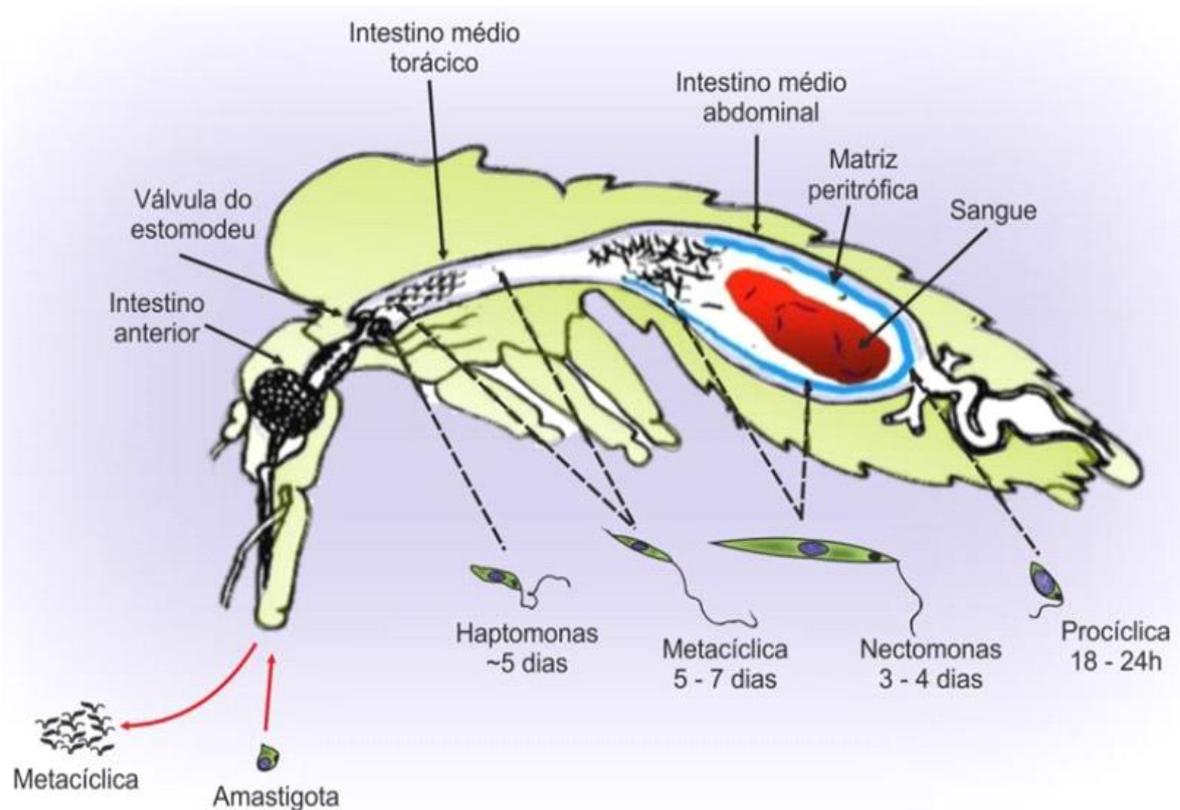


Figura 02. Esquema do ciclo de vida de *Leishmania* sp. no flebotomíneo (Fonte: Adaptação de RAMALHO-ORTIGÃO et al., 2010).

Diferentes estudos têm apresentado uma nova teoria para o papel dos neutrófilos na interação com parasitos do gênero *Leishmania*, chamada de “Cavalo de Tróia” (LASKAY et al., 2003; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Usando microscopia intravital, Peters et al. (2008) mostraram que promastigotas de *Leishmania (L.) major* invadem eficientemente neutrófilos que são recrutados para o local da picada do vetor ou da inoculação experimental, e que os parasitos permanecem viáveis dentro destas células.

A depleção de neutrófilos reduziu a habilidade do parasito em estabelecer uma infecção produtiva. Desta maneira, os neutrófilos seriam células hospedeiras temporárias de *Leishmania*, pois permitiriam uma entrada silenciosa dos parasitos nos macrófagos, que facilmente ingerem os neutrófilos apoptóticos infectados, sem ativar mecanismos nestas células (ROGERS et al., 2009).

No hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas vivem e se multiplicam também por divisão binária no interior dos vacúolos parasitóforos das células do sistema fagocitário mononuclear (LAINSON; RYAN; SHAW 1987) [Figura. 03]. Independentemente da entrada direta do parasito no macrófago, sua célula hospedeira definitiva, ou através do neutrófilo; uma vez dentro do mesmo, vários desafios devem ser vencidos para que a infecção se estabeleça com sucesso (ROGERS et al., 2009).

#### 1.4- Patogênese e Manifestações clínicas

A patogenia da LTA é fortemente influenciada por fatores inerentes ao hospedeiro (como características genéticas e resposta imunológica), ao parasito (como virulência da espécie de *Leishmania* infectante) e ao vetor (como sua capacidade vetorial). Como resultado dessa interação entre as diferentes espécies do parasito, do vetor e dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro vertebrado, um espectro de manifestações clínicas,

histopatológicas e imunopatológicas é observado no homem (COUTINHO et al., 1996; PRATES et al., 2011).

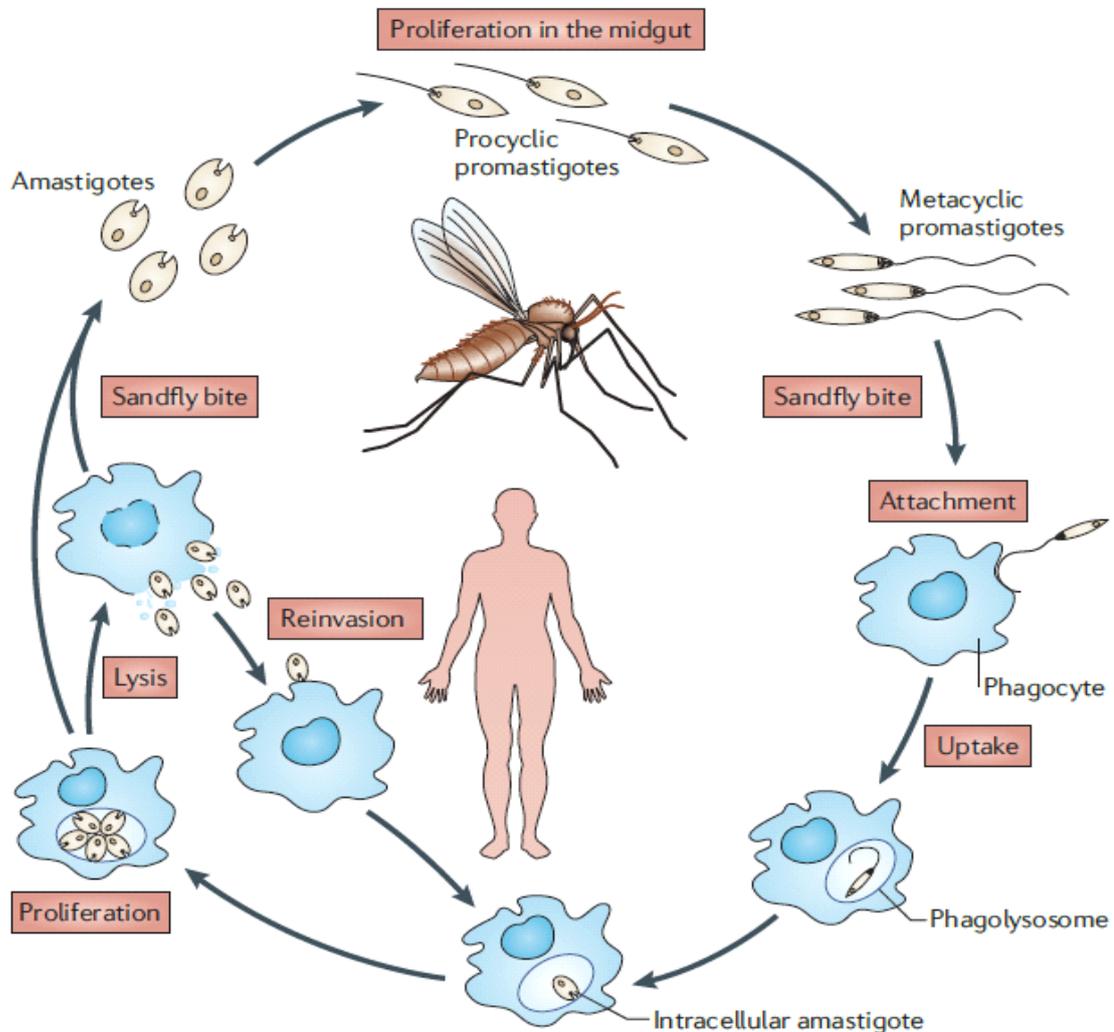


Figura 03. Ciclo biológico de *Leishmania* sp. - Promastigotas procíclicas diferenciam-se nos flebotomíneos infectados. A forma infectiva ao hospedeiro vertebrado-promastigostas metacíclicas são regurgitadas juntamente com a saliva do vetor. Promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos e por células encontradas no ambiente da inoculação. Após estabelecer uma resistência intracelular, formas promastigostas metacíclicas se transformam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária. Ocorre lise nos macrófagos e liberação das amastigotas. Ao realizar o repasto sanguíneo o hospedeiro invertebrado ingere as formas amastigotas. As formas amastigotas se transformam em promastigotas no tubo digestivo do flebotomíneo. As promastigotas se multiplicam por divisão binária e migram para a probóscida do vetor (Fonte: KAYE; SCOTT, 2011).

Após um período de incubação que varia de uma semana a três meses, a infecção cutânea pode permanecer subclínica ou no local da picada do inseto surge uma pápula ou nódulo eritematoso que evolui para úlcera e pode ser precedido ou acompanhado de aumento de um gânglio regional. A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais comum da doença com uma a 20 lesões, geralmente ulceradas ou úlcero-crostosas, em áreas descobertas do corpo. A úlcera típica é arredondada, não dolorosa e pode evoluir para cura espontânea ou progredir para uma das diferentes formas da doença, na dependência da resposta imune e da espécie de *Leishmania* (BRASIL, 2007).

A forma cutânea disseminada (LD) se caracteriza pela presença de mais de 10 lesões, geralmente acneiformes ou papulares, em duas ou mais áreas não contíguas do corpo. Em 29% dos casos pode ocorrer lesão de mucosa. A *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* são as duas espécies conhecidas como causadoras desta forma de LTA. Tem sido relatado o aumento no número de casos desta forma clínica, especialmente na região nordeste do Brasil (TURETZ et al., 2002). Recentemente foi proposta a forma Leishmaniose cutânea disseminada “borderline” (LCDB), sendo intermediária entre LCL e os pólos extremos patogênicos LCM e LCAD. O termo “borderline” foi usado para caracterizar a supressão parcial da resposta imune celular observada, havendo uma resposta CD4<sup>+</sup> mista (T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2). Embora respondam ao tratamento, os pacientes normalmente requerem uma ou mais séries de antimonial para alcançarem a cura clínica (SILVEIRA et al., 2004; 2008; 2009; COSTA et al., 2009).

A Leishmaniose cutâneo difusa (LCD) é uma forma anérgica, rara e caracterizada por lesões nodulares, ricas em parasitos, de difícil tratamento e prognóstico reservado. Foi descrita pela primeira vez na Amazônia brasileira, mais precisamente no estado do Pará, por Silva (1958), que relatou os primeiros achados clínicos sobre uma forma rara da leishmaniose tegumentar, ressaltando a natureza das lesões queloidianas na pele e lesões no tecido ósseo

das extremidades (mãos e pés) [SILVEIRA et al., 2009]. Tem sido relatada na América do Sul, América Central e Etiópia. As lesões são ricas em parasitos e as espécies envolvidas são *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) aethiopica* (GOTO; LINDOSO, 2010). Nas Américas, a *L. (L.) amazonensis* e a *L. (L.) mexicana* constituem os principais agentes da doença (LAINSON; SHAW, 1998). No Brasil, a *L. (L.) amazonensis* é considerada, até o momento, a única espécie com competência imunopatogênica para determinar a LCD (SILVEIRA et al., 2008, 2009).

A forma mucosa ou mucocutânea (LM ou LMC) tem incidência variando de 0,4 a 2,7% nas diversas regiões do Brasil (GONTIJO et al., 2002; DE CASTRO et al., 2005). Ocorre normalmente de um a cinco anos após a cura clínica da lesão cutânea, podendo ser concomitante ou aparecer até décadas depois. Acomete as mucosas oral, nasal, faríngea e laríngea, levando à destruição tecidual e lesões desfigurantes. Segundo Bedoya-Pacheco et al. (2011) a proporção de pacientes com forma mucosa aumenta com a diminuição da prevalência da LTA, reforçando o conceito de que a LM é secundária à forma cutânea mesmo quando a lesão cutânea não é detectada ou é auto limitada. Na Amazônia, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* são as espécies envolvidas nessa forma clínica (BARRAL et al., 1991; NAIFF et al., 1988; GUERRA et al., 2011). LMC causada por *L. (V.) guyanensis* parece ter relação direta com a interrupção do tratamento, provavelmente devido à variabilidade genética entre as cepas que resultam em diferentes susceptibilidades ao tratamento (GUERRA et al., 2011).

Em pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida, a LTA pode se manifestar durante a síndrome de reconstituição imune. Nestes casos, observa-se agravamento de lesões existentes ou reativação da infecção associada com a recuperação do número das células T CD4<sup>+</sup> e redução da carga viral após o início do tratamento antirretroviral altamente efetivo (HIRSCH et al., 2004). Os pacientes apresentam lesões polimórficas, variando de

pápulas, nódulos, placas e ulcerações até diferentes formas de lesões mucosas. Também foram descritas lesões genitais e a forma cutâneo difusa (POSADA-VERGARA et al., 2005; SINHA et al., 2008; LINDOSO et al., 2009; GOTO; LINDOSO, 2010).

#### 1.5- As espécies de leishmanias na Amazônia brasileira

As espécies de *Leishmania* envolvidas na transmissão da LTA apresentam características próprias com relação aos padrões epidemiológicos, à distribuição geográfica, aos vetores e reservatórios e às manifestações clínicas no hospedeiro vertebrado (GUERRA et al., 1998; 2001; 2006).

Na Amazônia, a LTA está agrupada em diferentes formas clínicas: leishmaniose cutânea, cutânea difusa, disseminada e mucocutânea. No Estado do Amazonas a leishmaniose cutânea é a de maior predomínio, principalmente na região de Manaus (BARRET; SENRA 1989; NAIFF et al., 1999; GUERRA et al., 2006) sendo um maior número de casos registrado no período das chuvas (Outubro a Maio) quando há aumento da densidade de vetores (GUERRA et al., 1998; 2001; 2006). Pode ser ocasionada por sete espécies de leishmanias, seis do subgênero *Viannia*: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e uma do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (SILVEIRA et al., 2002).

No estado do Amazonas, a transmissão pode ocorrer por cinco espécies distintas sendo: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (L.) amazonensis* e recentemente isolada a *L. (V.) lainsoni* (TALHARI et al., 2011).

A *L. (V.) guyanensis* é a espécie prevalente na etiologia da LTA no Amazonas, causando predominantemente lesões ulceradas cutâneas. Ocorre apenas na região norte da Amazônia, tendo sido recentemente descrita no Estado do Acre, áreas de colonização recente

e relacionada ao habitat de animais silvestres, como a preguiça de dois dedos, o tamanduá, os marsupiais e os roedores em florestas primárias e secundárias. Os flebotomíneos envolvidos na transmissão são *Lutzomyia umbratilis*, *L. anduzei* e *L. whitmani* (GUERRA, 2006; RANGEL; LAINSON, 2009).

A *Leishmania (V.) braziliensis* causa lesões cutâneas, mucosas, metastáticas e lesões disseminadas (SILVEIRA et al., 2004). Distribui-se amplamente no Brasil, tanto em áreas de colonização recente na Amazônia quanto em antigas do Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Sua transmissão está associada a *Lutzomyia wellcomei* em florestas da Amazônia, onde os reservatórios silvestres são ainda desconhecidos (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

A *L. (V.) naiffi* foi descrita por Lainson & Shaw em 1989, apresenta baixo grau de patogenicidade ao homem, estando associada somente a lesão cutânea (NAIFF et al., 1991; SILVEIRA et al., 2008; CAMPOS et al., 2008). Na Amazônia brasileira há relatos de casos nos Estados do Amazonas, Pará e Rondônia (LAINSON, 2010).

A *L. (V.) lainsoni* esta associada a vetores e reservatórios silvestres. Causa lesões ulceradas e tem como vetor *L. ubiquitous*, que é pouco antropofílica e sua transmissão é infrequente em humanos. Foi isolada nos estados do Pará, Amapá e Rondônia (LAINSON et al., 1990; SILVEIRA et al. 1987, 1991) e em 2011 no Amazonas (Talhari et al., 2011).

A *L. (L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, lesões anérgicas difusas e disseminadas (SILVEIRA et al., 2004; 2008; 2009). A transmissão está associada, geralmente, à presença de roedores silvestres e marsupiais. Os vetores incriminados são *L. flaviscutellata* e *L. olmeca nociva*, comumente encontrados em igapós, floresta primária e secundária na Bacia Amazônica. A *L. flaviscutellata* é considerada pouco antropofílica. Entretanto, a infecção ocorre em diferentes ambientes das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, provavelmente associada a ciclos enzoóticos de matas residuais (SILVEIRA 2009).

Os parasitos da espécie *L. (V.) lindenbergi* foram registrados em Belém-PA, em áreas de florestas degradadas. Apenas lesões cutâneas localizadas foram relatadas. Os reservatórios são provavelmente mamíferos terrestres e o provável vetor a *L. antunesi*. (SILVEIRA et al., 2002).

#### 1.6- Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana

O hospedeiro vertebrado desencadeia mecanismos de defesa ao parasito nos primeiros instantes da infecção, através do desenvolvimento de resposta inflamatória inespecífica com participação de componentes séricos e celulares (PRATES et al., 2011).

Em relação aos elementos séricos, o sistema complemento desempenha uma importante função na LTA já nos primeiros instantes após a introdução das promastigotas. A sua atuação leva a deposição de fragmentos de ativação sobre o parasito, os quais são essenciais para o estabelecimento da doença (COUTINHO et al., 1996; PRATES et al., 2011). Papéis antagônicos são atribuídos ao sistema complemento: capacidade lítica de parasitos extracelulares e o favorecimento da sobrevivência intracelular do protozoário pelo auxílio da fagocitose de *Leishmania* sp. pelos macrófagos, via receptores encontrados na superfície dessas células. Os efeitos líticos do soro normal podem ser desencadeados pela ativação da via clássica ou alternativa do sistema complemento pelo parasito (MOSSER et al., 1986). Porém, a susceptibilidade de *Leishmania* aos seus fatores, depende fundamentalmente, do estágio de desenvolvimento do parasito (HOWARD; GULL; MILES, 1987).

O primeiro mecanismo de escape dos promastigotas é evitar a lise direta através do sistema Complemento, tendo a participação de glicoproteínas (gp63) e açúcares da membrana do parasito (LPG). 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 mesmo; 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).

Após o escape 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 indireto, através de moléculas do soro associadas com moléculas do parasito e assim com os macrófagos (SACKS; SHER, 2002).

No momento que as formas promastigostas são depositadas na epiderme do hospedeiro pela saliva do flebotomíneo, os parasitos são captados por neutrófilos que são rapidamente recrutados. Outras células como os macrófagos e células dendríticas (DC) são também recrutadas pelo sistema imunológico, porém em menor extensão (AFONSO et al., 2008; LASKAY et al., 2008; PETERS; SACKS, 2009).

O parasito modifica sua forma para amastigota somente dentro dos macrófagos, pois os neutrófilos, uma vez infectados pelas promastigotas, sofrem um processo de apoptose. A *Leishmania* vive preferencialmente nos fagócitos mononucleares (macrófagos), mas alguns poucos parasitos foram descritos nas células dendríticas e neutrófilos (MURRAY et al., 2005; KAYE; SCOTT 2011).

Neutrófilos infectados que sofrerão apoptose serão ingeridos por macrófagos, que recebem um sinal inibitório e, assim, permitem a transformação das promastigotas em amastigotas. Citocinas e quimiocinas secretadas por neutrófilos podem modular o desenvolvimento da resposta imune à infecção (RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). A interleucina 12 (IL-12) é primariamente liberada, sendo o sinal chave para recrutamento das

células Natural Killers (NK), células  $CD4^+$ T helper ( $T_H1$ ) e linfócitos T  $CD8^+$  para produção de interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF). Esse processo ativa os macrófagos que irão expressar indoleamina-2, 3-dioxigenase (IDO), óxido nítrico sintase indutível (iNOS) reação da NADPH oxidase dos fagócitos (Phox). IDO esgota o parasito de triptofano (Trp), enquanto que iNOS e Phox geram substâncias leishmanicidas; por exemplo, óxido nítrico (NO) e os intermediários de oxigênio. Alguns poucos parasitos podem escapar da morte podendo persistir ao longo da vida no organismo hospedeiro, mesmo após cicatrização da lesão (BODGAN, 2012) [Figura. 04].

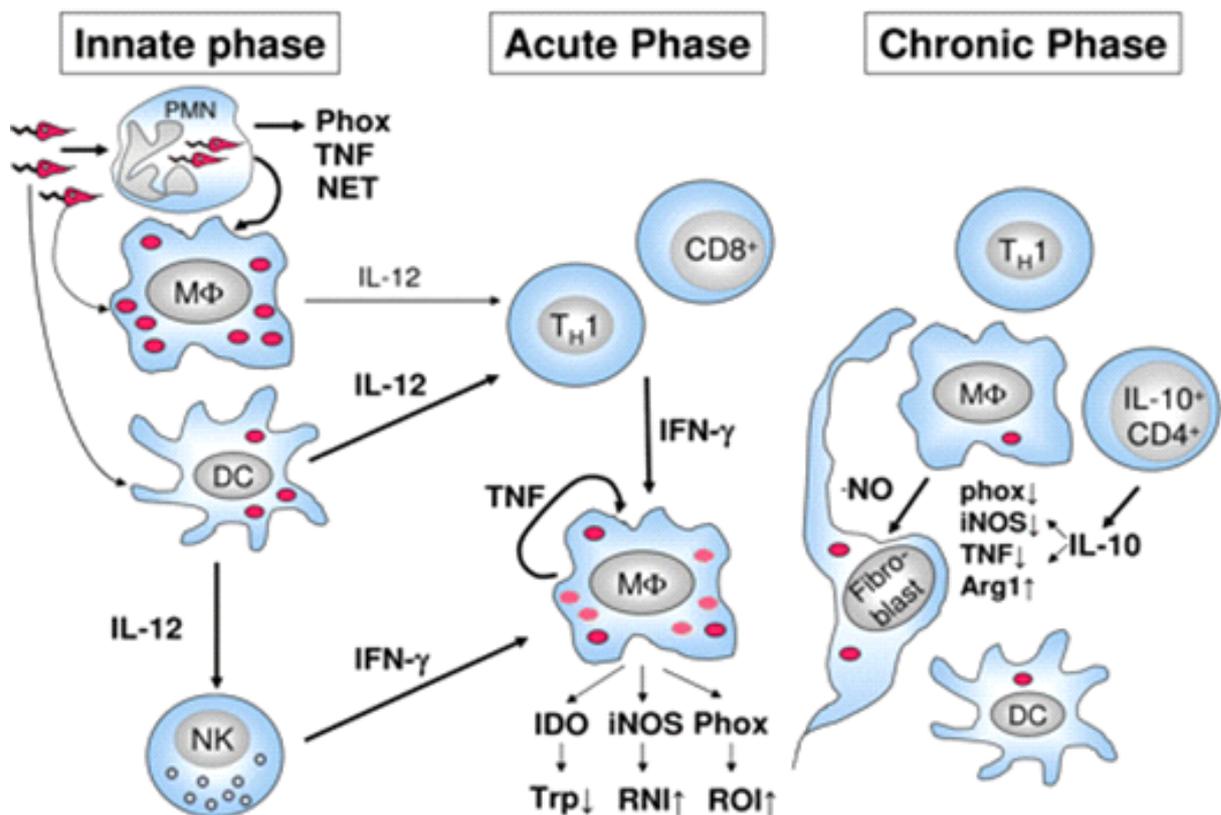


Figura 04. Apresentação do parasito frente à resposta imune do hospedeiro (Fonte: BODGAN, 2012).

Estudos experimentais apontam que nas leishmanioses, a resposta imune é predominantemente mediada por células, envolvendo todos os mecanismos associados à cura, proteção ou ao agravamento da doença. Infecções por *L. (V.) major*, que é o modelo mais bem estudado, quando ocorrem em camundongos resistentes (C57BL/6) estão associadas a uma resposta T<sub>H</sub>1, enquanto em camundongos susceptíveis (BALB/c) vinculam-se à resposta do tipo T<sub>H</sub>2 (SCOTT, 1991; KEMP; THEANDER;, KHARAZMI, 1996; SACKS; SHER, 2002; MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011; McCONVILLE; NADERER, 2011) . A função dos linfócitos T com fenótipo CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2) é importante na instalação da doença. Os linfócitos T<sub>H</sub>1 produzem IFN-  $\gamma$ , IL-2, IL-12, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e TNF, que levam a ativação de macrófagos e a destruição dos parasitos (HOLZMULLER; BRAS-GONÇALVES; LEMESRE, 2006; REIS et al., 2006). Por outro lado, o perfil T<sub>H</sub>2 produz IL-4, IL-5, IL-10, que inibem a ativação de macrófagos e levam a ativação de linfócitos B, com a produção de anticorpos preferencialmente das classes IgG1 e IgE (COUTINHO et al., 1996; LIESE et al., 2008; KAYE; SCOTT, 2011).[Figura 05].

A cronicidade da infecção e a carga parasitária parecem ter relação com a intensidade da resposta imune humoral. Altos níveis de IgE foram vistos em soros de pacientes com maior tempo de evolução da doença e em pacientes que apresentavam lesão mucocutânea (O'NEIL; LABRADA; SARAVIA, 1993).

Níveis elevados de IgG, com predomínio de IgG1 e IgG3, foram observados em pacientes com leishmaniose cutânea ativa (OZBILGE et al., 2006). No entanto, diferentes estudos (CASTELLANO et al., 2009; FAGUNDES-SILVA et al., 2012) mostraram que após cura clínica e tratamento com antimonial, o nível dessas subclasses de imunoglobulinas decresce, sugerindo que estas poderiam ser úteis tanto como marcadores de monitoramento do tratamento, quanto para auxiliar na decisão de interrupção do acompanhamento ambulatorial de pacientes após cura clínica (OZBILGE et al., 2006).

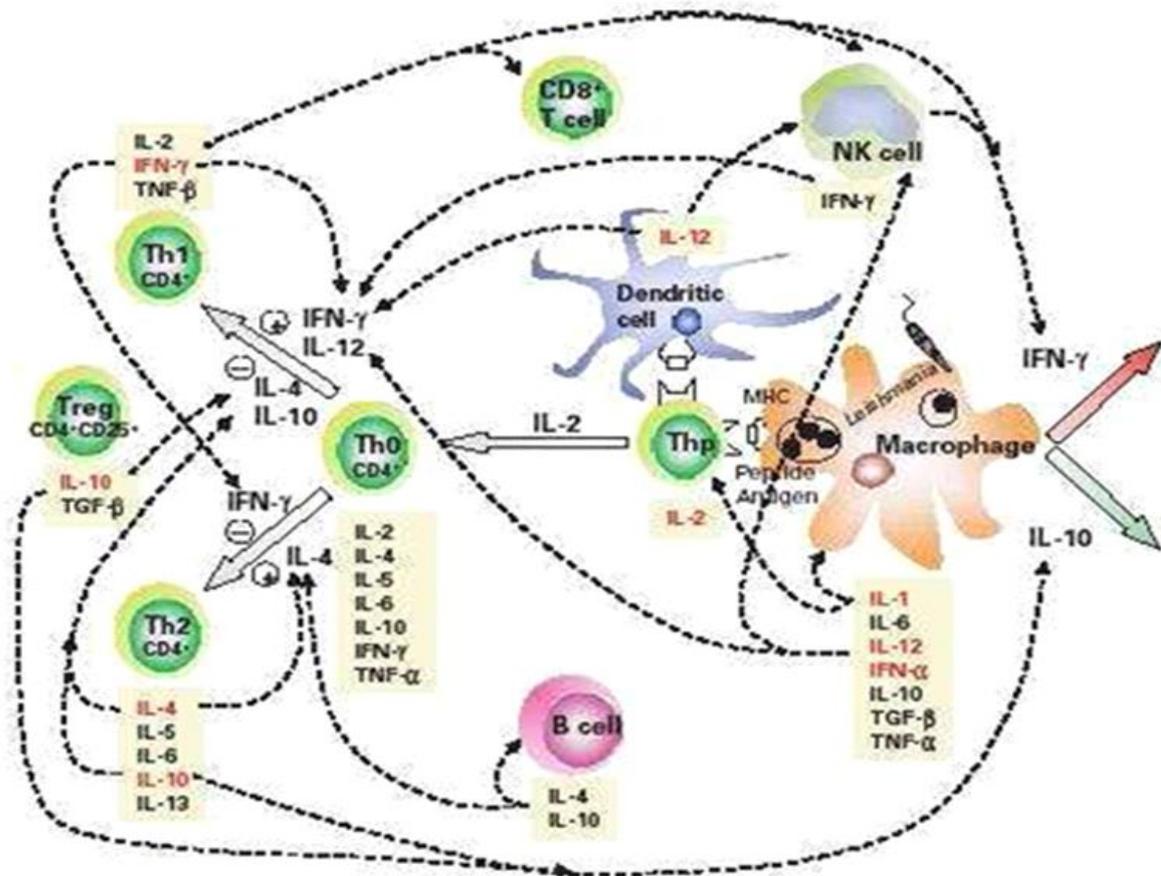


Figura 05. A produção de citocinas pelos macrófagos, células dendríticas, células T e B determinam o desenvolvimento da infecção pela *Leishmania* (Fonte: adaptação de HOLZMULLER et al., 2006).

Evidências obtidas em diferentes pesquisas sobre a resposta imune celular periférica e *in situ* em LTA associada com: *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) major*, podem ser citadas:

- A LC causada por *L. (V.) braziliensis* é caracterizada por fortes respostas celulares e números escassos de parasitos nas lesões (CARVALHO et al., 2012). A presença de IFN-γ e TNF-α é determinante para o controle da disseminação do parasita, mas uma resposta exagerada  $T_H1$  tem sido associada com a uma infecção grave observada em lesões de LC (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; BACELLAR et al., 2002; ANTONELLI et al., 2005;

FARIA et al., 2005; CARVALHO et al., 2007; FARIA et al., 2009). Atribuindo ao sistema imunológico uma função importante tanto no controle, como na reativação da doença após longos períodos de desaparecimento das lesões primárias (WALTON et al., 1973; BODGAN, 2012);

- Trabalhos recentes com cepas de *L. (V.) braziliensis* revelam uma dicotomia na LC em humano, demonstrando a presença de células T CD8<sup>+</sup> granzima B<sup>+</sup> na lesão tecidual crônica, enquanto que células T CD4<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$  levam a morte do parasito (SANTOS et al., 2013). A presença de CD8<sup>+</sup> em lesões com maior tempo de evolução pode sugerir que elas desempenhem um papel importante no processo de cicatrização (DA-CRUZ et al., 2005) e estejam envolvidas na patogênese da leishmaniose mucocutânea (LCM) (BARRAL-NETO et al., 1995; BRODSKYN et al., 1997; SANTOS et al., 2013);

- Associação da citotoxicidade do CD8<sup>+</sup> na progressão da infecção de LC em humanos foi relatada por Faria et al. (2009). Além disso, dados sobre a citotoxicidade de células T CD8<sup>+</sup> no desenvolvimento da malária cerebral mostram que esse mecanismo pode contribuir para a imunopatologia dessa infecção (HAQUE et al., 2011);

- Recentemente, Hernandez-Ruiz et al. (2010) observou um grande número de macrófagos em lesões cutâneas de pacientes infectados com *L. (L.) mexicana*, possivelmente induzido por CD8<sup>+</sup>, que exercem o papel de citotoxicidade e são importantes fontes de citocinas (BOURREAU et al., 2007; JORDAN; HUNTER, 2010; NATEGHI ROSTAMI et al., 2010). Em infecções por *L.(V.) major* essas células estão associadas ao perfil T<sub>H</sub>1, estimulando IFN- $\gamma$  e atuando na resolução da infecção (DA-CRUZ et al., 2005; NATEGHI ROSTAMI et al., 2010). De certa forma, a ativação de CD8<sup>+</sup> nos momentos iniciais da infecção parece ter indução na resposta protetora (POMPEU et al., 2001) e ainda na eficácia de diferentes esquemas de imunização (JAYAKUMAR et al., 2011) ;

- Diferenças no padrão de citocinas produzidas por pacientes com LCD e LMC. A primeira delas está associada com um padrão tipo  $T_H1$  (IFN- $\gamma$ , IL-2) (CARVALHO et al., 1995), enquanto que a segunda tem sido associada com um padrão de misturas  $T_H1$  e  $T_H2$  (CASTÉS et al., 1984; PIRMEZ et al., 1993; COUTINHO et al., 1996). Especula-se que quando ambos os padrões de citocinas são produzidas, a resposta tipo  $T_H2$  pode predominar sobre  $T_H1$  e a doença pode permanecer em estado crônico (COUTINHO et al., 1996);
- Existem divergências nos resultados da resposta linfoproliferativa *in vitro* das células T frente ao antígeno de *Leishmania*. PIRMEZ et al. (1993) referem níveis semelhantes em LC e em LMC (*L. (V.) braziliensis*), enquanto que AJDARY et al. (2000), CÁSTES et al. (1993) relatam níveis claramente baixos em lesões crônicas ou mucocutâneas (*L. (V.) major*, *L. (V.) braziliensis*);
- Infecção crônica causada por *L. (L.) mexicana* em camundongos apresentam níveis elevados de IL-10; exercendo múltiplas funções imunossupressoras, como diminuição de células T, diminuição na produção de IL-12 e inibição de iNOS (óxido nítrico), fator necessário para a morte do parasito (BUXBAUM, SCOTT; 2005; THOMAS; BUXBAUM, 2008; BUXBAUM, 2013);
- Alguns estudos (KIMA et al., 2000; BUXBAUM, SCOTT; 2005; BUXBAUM, 2013) têm mostrado que receptores de superfície celular de IgG e Fc $\gamma$ R, são necessários ao estabelecimento da doença crônica causada por *L. (L.) mexicana*, podendo o parasito suprir a resposta  $T_H1$  através da via de IgG-Fc $\gamma$ R, utilizando IgG do hospedeiro vertebrado.
- Infecções por parasitos do gênero *Leishmania* levam a uma ativação rápida e transitória de células natural killer (NK). A ativação das células NK em camundongos requer a presença de receptores Toll-like e estimulação das células dendríticas (DC), sendo seguido pela presença de IL-12 (BODGAN, 2012). Embora as células NK pareçam não ser essencial para o controle final da leishmaniose cutânea e podem apresentar funções imunossupressoras,

elas desempenham papel importante na produção de IFN- $\gamma$  que induzem atividade leishmanicida dos macrófagos e ajudam a preparar uma resposta de células T auxiliares de proteção (KELLY; STETSON; LOCKSLEY, 2003; LAOUAR et al., 2005; PRAJEETH et al., 2011).

Na última década, foi identificada uma nova subpopulação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> produtores de IL-17, comumente conhecidos como T<sub>H</sub>17. O papel da IL-17 no tratamento da leishmaniose humana ainda não está esclarecido. Na leishmaniose visceral, a IL-17 tem sido associada à proteção (PITTA et al., 2009). Por outro lado, verificou-se um aumento na produção de IL-17 em pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* e havia uma correlação direta entre a magnitude do infiltrado celular e essa citocina (BACELLAR et al., 2009).

A associação entre o aumento de IL-17 e neutrófilos também foi observada em pacientes com infecção mucocutânea por Boaventura et al. (2010), firmando assim o papel desta citocina na patogênese da reação inflamatória na leishmaniose. Como é o caso de todos os subconjuntos celulares para a diferenciação de CD4<sup>+</sup> T helper, o desenvolvimento e manutenção das células T<sub>H</sub>17 são dependentes de combinações específicas de citocinas, que podem incluir TGF, IL-6, IL-23 e IL-1 $\beta$  (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; SOUZA et al., 2012). Camundongos C57BL/6 que apresentavam LMC causada por *L. (V.) major*, apresentaram baixos níveis de IL-10 e uma resposta inflamatória exagerada com níveis elevados de IL-17; tal citocina contribuiu para o aumento de neutrófilos e progressão da doença. Surpreendentemente, IFN- $\gamma$  foi regulado por IL-17 e não contribuiu para o aumento da doença (GONZALEZ-LOMBANA et al., 2013). Estudos adicionais descobriram que o receptor de IL-1 foi essencial, tanto para a resposta a IL-17 como no aumento da patologia (GONZALEZ-LOMBANA et al., 2013).

A presença de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) tem demonstrado um relevante papel no controle da resposta contra parasitos do gênero *Leishmania* por suprimir as

funções efetoras dos linfócitos  $T_{H1}$  e, dessa forma, favorecer a sobrevivência dos parasitos. A produção de IL-10 por células T  $CD4^+/CD25^+$  (Treg) pode estar relacionada à persistência da *Leishmania* e reativação da doença (BITTAR et al., 2007). Estudos recentes para IL-10 utilizando camundongos “*knock-out*” infectados com baixa dose de parasitos desenvolveram resposta imune celular aumentada e eliminação total dos parasitos. Esses camundongos perderam a imunidade à reinfecção, sugerindo, portanto, que a persistência parasitária é necessária para manter a imunidade (KAYE; SCOTT, 2011).

A correlação da resposta imune humana frente à infecção e o desenvolvimento das características clínicas, não está bem caracterizada como a resposta em camundongos (ROGERS et al., 2002). Alguns trabalhos que descrevem o papel das diferentes células, citocinas e moléculas co-estimuladoras na infecção humana são mencionados a seguir:

- Pacientes que contraem a LC desenvolvem uma resposta do tipo  $T_{H1}$  no nível das lesões. A LMC, que constitui uma forma crônica associada à destruição de mucosas, caracteriza-se por uma mistura de resposta dos tipos  $T_{H1}$  e  $T_{H2}$ , enquanto pacientes com a forma difusa exibem uma resposta quase exclusivamente do tipo  $T_{H2}$  (PIRMEZ et al., 1993; TAPIA et al., 1993);
- Nas LC e LMC, a imunidade celular e a predominância de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 têm sido associadas à resposta do tipo  $T_{H1}$ ; já o perfil  $T_{H2}$  tem sido relacionado com a leishmaniose cutânea difusa, com presença de IgG4 (RODRIGUEZ et al., 1996; SOUZA et al., 2005). Entretanto, o papel da resposta imune humoral na LTA não está totalmente esclarecida e não se sabe, ao certo, o papel dos anticorpos específicos na imunidade contra *Leishmania* em humanos (TRUJILLO et al., 1999; SOUZA et al., 2005);
- A LC é a mais comumente encontrada nos pacientes com LTA. As lesões são geralmente ulceradas e apresentam poucos parasitos com tendência para uma boa resposta ao tratamento (DA-CRUZ et al., 2002). Há uma forte resposta de células T, com citocinas do tipo

T<sub>H</sub>1, como IFN- $\gamma$  e IL-12, e uma alta frequência de células B (LOUZIR et al., 1998; VIEIRA et al., 2002). Em alguns casos pode ocorrer cura espontaneamente ou evoluir para formas mais graves da doença (GOTO; LINDOSO, 2010);

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

- A LMC é caracterizada por lesões destrutivas das mucosas, principalmente boca e nariz, não ocorrendo cura espontânea. Apresenta uma elevada resposta por células T específicas, tanto T<sub>H</sub>1 como T<sub>H</sub>2, sendo direcionada para uma resposta do tipo T<sub>H</sub>1 que é mais forte quando comparada com lesões cutâneas localizadas. A resposta exacerbada do tipo T<sub>H</sub>1 está associada a uma crônica e severa destruição tecidual, em razão de uma forte resposta inflamatória, e à escassez de parasitos nas lesões (MARSDEN, 1986; BACELLAR et al., 2002; MATOS et al., 2005). Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são produzidas, além de IL-4. Essa resposta é fracamente regulada por IL-10 e TGF- $\beta$ , encontradas em níveis diminuídos, mostrando que uma resposta inadequada do tipo T<sub>H</sub>1, considerada protetora na maioria das formas dessa doença, pode levar a uma imunopatogênese exacerbada (BACELLAR et al., 2002; AMATO et al., 2003). Níveis elevados de anticorpos circulantes, como IgG1 e, principalmente IgG3 são associados a LM (RODRIGUEZ et al., 1996; JUNQUEIRA PEDRAS et al., 2003). A ativação de células T é também influenciada pela co-estimulação dessas células pelas células que apresentam antígenos. A co-estimulação através da molécula CD28 nas células T resulta na eficiente ativação e proliferação de células T induzidas pelo antígeno e prolonga a sobrevivência celular e a produção de citocinas (ELLOSO; SCOTT, 1999);

- Na LMC, causada especialmente por *L. (V.) braziliensis*, os pacientes apresentam forte resposta imune celular, concomitante a uma progressiva destruição tecidual. A resposta à intradermoreação com antígenos de *Leishmania* é mais forte do que a de pacientes com LC e as concentrações de IFN, IL-2, IL-5 e TNF se apresentam mais elevadas. Nas lesões, há um intenso infiltrado inflamatório rico em linfócitos e plasmócitos, com poucos macrófagos contendo escassos parasitos. Existe uma mistura das respostas T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2 com elevados níveis de IL-2, IL-4, IL-5 e TNF, o que explica a não resolução da doença (CONVIT et al. 1993; PIRMEZ et al., 1993; RIBEIRO-JESUS et al., 1998). A maioria dos linfócitos é CD4<sup>+</sup> com perfil T<sub>H</sub>1, havendo elevada concentração de TNF nas lesões, o que pode ser acompanhado ou não da concentração de IL-4 (TAPIA et al., 1993; SILVEIRA et al., 2004). A expressão de iNOS nas lesões de pacientes com leishmaniose mucocutânea parece ser similar àquela de pacientes com LC (DIAZ et al., 2006). Não existem marcadores imunológicos que possam identificar os pacientes com leishmaniose cutânea que apresentam risco de desenvolver a forma mucosa da leishmaniose (BARRAL-NETTO et al., 1995).

- A LCD apresenta forte expressão da resposta imune celular do tipo CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2 (SILVEIRA et al., 2008; 2009). Desse modo, o quadro clínico da doença, independentemente da região geográfica de ocorrência, resulta, primordialmente, da imunossupressão celular específica induzida pelo parasita, gerando forte inibição da resposta de hipersensibilidade celular, pobre proliferação de linfócitos, baixa produção de IFN- $\gamma$  e, conseqüentemente, fraca ativação dos macrófagos parasitados, impossibilitando aos pacientes o controle da infecção (SILVEIRA et al., 2009). Indivíduos com LCD apresentam múltiplos nódulos e falham em produzir uma resposta imune mediada por células durante a infecção, sendo incapazes de controlar a multiplicação parasitária e a progressão da doença, em conseqüência da falta da expressão de mRNA para IFN- $\gamma$  e da baixa concentração para IL-2. Apresentam ainda elevados títulos de anticorpos específicos contra *Leishmania* (BOMFIM et al., 1996;

TRUJILLO et al., 1999). Esses pacientes não apresentam cura, são altamente resistentes à quimioterapia e exibem uma resposta do tipo  $T_H2$ , com elevados níveis de IL-4 (TAPIA et al., 1993; BOMFIM et al., 1996).

- Pacientes com a forma assintomática apresentam taxa de infecção mais baixa e um número menor de formas amastigotas nas células em comparação com LC e LMC causada por *L. (V.) braziliensis* (GIUDICE et al., 2012). Na análise da cultura celular de indivíduos com LC, LMC foi observada alta produção de TNF enquanto que o mesmo não foi encontrado nos pacientes com infecção assintomática. A produção de NO pelos macrófagos foi verificada em todos os grupos, porém, sem diferença significativa entre os mesmos. Indicando assim a importância dos macrófagos no controle da infecção (GIUDICE et al., 2012).

Recentemente, novos fatores também parecem ser importantes na evolução da LMC: a infecção da *L.(V.) guyanensis* por um vírus RNA (LRV1) endógeno que intensifica a resposta imune. Questiona - se a influência deste vírus na resposta do macrófago e na manutenção de uma resposta imune ativa, facilitando a disseminação do parasito e aumentando, conseqüentemente, a incidência de formas graves (IVES et al. 2011, SCOTT 2011).

Portanto, para o estabelecimento da infecção, a *Leishmania* precisa sobreviver a diferentes processos, utilizando mecanismos que auxiliam nas estratégias de escape da defesa do hospedeiro. O evento crucial para indução da resposta imune curativa contra a *Leishmania* é a eficiente ativação de células capazes de produzir citocinas protetoras que levem à ativação de macrófagos, via IFN- $\gamma$ , resultando na síntese de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativo e, conseqüentemente, na morte dos parasitos intracelulares (SALAIZO-SUAZO et al., 1999). Enquanto que a sobrevivência e persistência parasitária dependem de estratégias de escape da resposta imune inata e adaptativa (REIS et al., 2006).

A resposta imunológica desempenha então, um papel essencial no curso da patogenia, uma vez que pode controlar a infecção desencadeada pelos parasitas, mas também pode promover o desenvolvimento de formas crônicas e mais graves da doença. Esse aspecto particular da resposta imune frente à infecção fortalece a necessidade de estudos relacionados ao seu conhecimento e papel, tanto no curso clínico da infecção, como no processo de cura das diferentes formas cutâneas da Leishmaniose.

### 1.7- Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da LTA baseia-se em dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. A confirmação laboratorial deve ser preferencialmente por meio do encontro do parasito em tecido cutâneo, devido ao fato de suas manifestações clínicas se assemelharem a lesões ulceradas ou não de outras doenças como a hanseníase virchowiana, paracoccidiodomicose, úlcera tropical, sífilis, tuberculose cutânea, entre outras (CARVALHO; GONTIJO, 2003). O tempo de evolução da lesão cutânea é inversamente proporcional ao número de parasitas encontrados, sendo rara a presença após um ano (CARVALHO; GONTIJO, 2003).

A pesquisa de formas amastigotas do parasito em amostras obtidas através de escarificação, impressão por aposição em lâminas ou biópsia da lesão, coradas (Giemsa, Leishman, Panótico) tem sensibilidade de 15 a 30%, chegando a 44 - 58% quando se associa a cultura em meio de cultivo bifásico NNN e a 38 – 52% com a inoculação em hamster, sendo este último, reservado para investigações em pesquisas científicas (BRASIL, 2000; 2007).

A imunohistoquímica, realizada em fragmentos de biópsia, pode evidenciar a forma amastigota ou seu antígeno em até 88,5% quando se usa imunofluorescência e em 58,6 a 64,5% com a técnica da imunoperoxidase (PERINOTO et al., 2010). Assim, os métodos utilizados para a detecção do parasito têm baixa sensibilidade e não identificam as espécies de

*Leishmania*. Detecção do DNA da *Leishmania* através da reação em cadeia da polimerase (PCR), além de ter a mesma sensibilidade dos métodos parasitológicos para evidenciar o parasito, também identifica a espécie, é específico, rápido e pode ser usado em diferentes amostras biológicas (WEIGLE et al., 1987; SOTTO et al., 1989; SCHUBACH et al., 2001; REITHINGER et al., 2007). A PCR em tempo real, usando iniciadores específicos para gêneros e espécies de *Leishmania*, tem sido avaliada recentemente, com resultados promissores quando comparada à técnica convencional (CASTILHO et al., 2008; ANTINORI et al., 2009).

Os testes imunológicos utilizados na prática clínica são indicadores indiretos da infecção por *Leishmania*. O teste de intradermorreação de Montenegro (IDRM) indica infecção, mas não distingue se a infecção é presente ou passada, assim sua importância diagnóstica fica prejudicada para pacientes oriundos de áreas endêmicas, pois, indivíduos assintomáticos podem apresentar teste positivo (GOTO et al., 2010). Em pacientes tratados, a IDRM permanece positiva ainda por tempo indeterminado, sendo que em casos de infecção por *L. major* foi observada positividade por mais de 19 meses após o tratamento (SASSI et al., 1999). O teste de Montenegro encontra-se positivo em mais de 80% dos pacientes com LC, LD e LM, enquanto que na LCD é persistentemente negativo (COSTA et al., 1986; REIS et al., 2009).

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

através da combinação de diferentes marcadores. Esse método demonstrou ser bastante eficiente no estudo de infecções causadas por *Leishmanias* (DA-CRUZ et al., 2005).

## 1.8- Tratamento

O tratamento da LTA é baseado em quimioterapia e depende da forma clínica e comorbidades. Deve ser realizado para controle e cura da infecção, assim como para evitar casos de persistência e disseminação do parasita (REITHINGER et al., 2007).

### 1.8.1- Antimonial pentavalente

Os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (Glucantine®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) formam a “primeira-linha” de fármacos no tratamento da LTA. Eles aumentam a capacidade fagocítica dos neutrófilos, com o aumento da produção de superóxido e, portanto, podem destruir o parasito por mecanismos diretos e indiretos (MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008).

Apesar dos antimoniais serem as principais drogas contra a *Leishmania*, usadas há mais de 50 anos, ainda não se sabe corretamente o mecanismo de ação destas drogas (OUELLETTE, 2001). Os antimoniais pentavalentes são fármacos leishmanicidas que interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP. Os compostos de antimônio pentavalente, como o estibogluconato de sódio, exercem pouco efeito sobre as formas promastigotas que crescem em culturas de tecidos (MS 2007). Para agir contra o parasita é necessário que o antimonial pentavalente entre no fagolisossomo do

hospedeiro e seja reduzido à sua forma trivalente ou forma ativa. Essa redução pode ocorrer no contato com o parasito, no macrófago ou em ambos. O mecanismo e o local dessa redução ainda não estão completamente esclarecidos (OUELLETTE, 2001).

A dosagem recomendada é de 20 mg/kg/dia via intramuscular ou intravenosa, por um período de 20 dias (MOMENI; REISZADAE; AMINJAVAHERI, 2002). Baixas dosagens ou descontinuidade do tratamento são as principais causas do aumento de recidivas e resistências do parasito a esses fármacos (OLIVEIRA et al., 2011). Há preocupações sobre o custo, toxicidade e desenvolvimento de resistência medicamentosa. Fármacos antimoniais são associados aos efeitos adversos, incluindo náuseas, vômitos, diarreia, erupções na pele, tontura, arritmia cardíaca, hipotensão, artralgia, mialgia, desconforto abdominal, dor de cabeça e elevação reversível de enzimas hepáticas, trombocitopenia e anemia ocasional que muitas vezes são dependentes da dose (OLIVEIRA et al., 2011). Os antimoniais estão contraindicados em pacientes que fazem uso de beta-bloqueadores (principalmente sotalol e propranolol) ou antiarrítmicos, como a amiodarona e quinidina. Os efeitos colaterais relacionados ao aparelho gastrointestinal são frequentes e incluem náuseas, anorexia e dor abdominal. A hepatotoxicidade também é frequente e pode ocorrer em até 50% dos pacientes tratados (FRANKE et al., 1990).

Em trabalho recente, foi demonstrado o aumento da produção *in vitro* do TNF- $\alpha$  na presença de Glucantime® e, conseqüentemente, da expressão de óxido nítrico. Além disso, houve aumento da função fagocitária de monócitos e neutrófilos de indivíduos saudáveis através do sistema Complemento, provavelmente relacionado à possível habilidade do antimonial em aumentar a expressão de receptores para o sistema Complemento na membrana dos fagócitos (MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008). Cepas de *L. (V.) braziliensis* de pacientes refratários (tratados com mais de três ciclos de antimonial) foram mais resistentes ao óxido nítrico *in vitro* que cepas de pacientes responsivos. Giudice et al.

(2007) observaram que a resistência de cepas de *Leishmania* ao óxido nítrico confere benefício à sobrevivência dos parasitos no interior dos macrófagos e possivelmente agrava o curso clínico da LTA e, além disso, pacientes infectados com cepas de *L. (V.) braziliensis* resistentes apresentavam lesões cutâneas maiores que pacientes infectados com cepas não resistentes.

Trabalhos recentes utilizando antígenos solúveis (formados por proteínas do citoplasma do parasito) e insolúveis (constituído de fragmentos de membrana) de *L. (V.) braziliensis* detectaram diferentes respostas celulares frente ao tratamento com antimonial. Reis et al. (2009), utilizando antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis*, concluíram que há resposta proliferativa e produção de IL-10 e IFN- $\gamma$  específicas antes e após tratamento quimioterápico, havendo aumento na produção de IL-10 e diminuição de IFN- $\gamma$  após terapia. Souza et al., (2012), também observaram depleção de IFN- $\gamma$  após tratamento, mas aumento da produção de TNF- $\alpha$  e NO, utilizando antígeno solúvel. No entanto, Brelaz-de-Castro (2012), detectaram aumento da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , sendo este último, só quando estimulado com a fração antigênica solúvel, sendo que pacientes com cura espontânea apresentaram o mesmo perfil. Houve também maior expressão de linfócitos TCD8, citocinas do tipo 1, assim como de CD25 e IL 10, sugerindo mecanismos regulatórios.

Outros autores também observaram uma maior produção de IFN- $\gamma$  após terapia utilizado antígeno total obtido a partir de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (DA CRUZ et al., 2002; TOLEDO et al., 2001).

Em estudos realizados por Brito et al. (2000; 2001), utilizando antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis*, observaram diminuição da reatividade de anticorpos IgG a antígenos de 27 e 30 kDal em soro de pacientes após cura clínica com antimoniais. A frequência destes antígenos diminuiu cerca de duas vezes em pacientes clinicamente curados, sugerindo que

eles poderiam ser úteis como marcadores de cura da LTA. Perfil similar de resposta humoral também foi observado em pacientes curados espontaneamente.

Viana et al. (2013) analisando aspectos histopatológicos e imunológicos de lesões de pacientes com LTA, antes e depois do tratamento com Glucantime, observaram que a concentração de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 e IL-10 foi menor após o tratamento. Antes do tratamento observaram aumento da concentração de citocinas T<sub>H1</sub> e após tratamento houve redução na resposta inflamatória e mistura de respostas T<sub>H1</sub> e T<sub>H2</sub>.

A resposta do paciente ao tratamento com antimonial pode variar de acordo com a espécie e cepa do parasito, o estado imunológico do paciente e a forma clínica da doença (AREVALO et al., 2007; GUERRA et al., 2011; NEVES, 2010; PIMENTEL et al., 2011; ROMERO et al., 2001; SILVEIRA, 2009). No Brasil, há uma resposta precária ao antimonial em pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis*, espécie prevalente no estado do Amazonas (ROMERO et al., 2001; NEVES, 2010).

#### 1.8.2- Outros medicamentos

Quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade do seu uso, a anfotericina B e o isotionato de pentamidina são as drogas de segunda escolha.

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo poliênico, que interage com o ergosterol da membrana celular, formando poros que alteram a permeabilidade celular e o balanço iônico, causando a morte da célula (TRACY et al., 2001). É contraindicada a administração em cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas. A anfotericina B é administrada por via endovenosa, gota a gota, na dose diária de 0,2 mg/Kg/dia até no máximo 50mg. É dissolvida em soro glicosado 5% com tempo de infusão de 3 a 4 horas. Face a necessidade de internação, seu uso é limitado (BRASIL, 2010). Os efeitos adversos mais

frequentes são febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão (TRACY et al., 2001).

A pentamidina é um derivado sintético da amidina, eficaz contra grande número de protozoários patogênicos, incluindo espécies de *Leishmania* (BALANÃ-FOUCE et al., 1998). Atualmente, é comercializada para uso humano apenas sob a forma liofilizada de isotionato de pentamidina, em frascos contendo 300 mg do sal. O mecanismo de ação da pentamidina ocorre por inibição de diferentes processos celulares, ainda não totalmente elucidados. Recentemente, resistência à pentamidina tem sido descrita em tripanossomas e *leishmanias* (WERBOVETZ, 2006; BOURREAU et al., 2009).

O isotionato de pentamidina é completamente absorvido após a administração parenteral. Conforme dados do fabricante (Pentacarinat®/Sanofi Aventis), após administração intramuscular (4 mg/kg), a droga atinge a concentração plasmática máxima de aproximadamente 0,2 µg/mL; a meia-vida de eliminação é de 9,4 horas ( $\pm 2,0$ ); a eliminação renal da substância não-modificada, em 24 horas, é de 4,1%; a depuração renal (clearance) é de 15,4 l/h ( $\pm 14,9$ ) [NEVES et al., 2011]. As principais reações adversas são dor, endureção e abscessos estéreis no local da aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, mialgia, cefaleia, hipotensão, hipoglicemia e hiperglicemia transitórias (NEVES et al., 2011).

Outros fármacos como azitromicina, allopurinol em associação com antimoniais, dapsona, rifampicina, imidazóis e miltefosina também tem sido utilizados. O uso tópico de paramomicina tem se mostrado promissor assim como calor e mais recentemente a terapia fotodinâmica associada ao uso de antimoniais (ARANA et al., 2001; SOTO et al. 2004; LIMA et al., 2007; VAN DER SNOEK et al., 2008).

A miltefosina é administrada em comprimidos, via oral, na dose de 2,5mg/Kg/dia, máximo de 150mg/dose, durante 28 dias. Os efeitos colaterais mais frequentemente observados são náuseas, vômitos e dor abdominal (MACHADO et al, 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1- Objetivo Geral

Caracterização do perfil da resposta imune de pacientes com LTA antes e após tratamento com antimonial pentavalente, avaliando a concentração de algumas citocinas, imunoglobulinas (IgG e IgM) e o percentual de populações celulares no sangue periférico.

### 2.2- Objetivos Específicos

✓ Detectar a presença de populações celulares, citocinas e imunoglobulinas envolvidas na resposta imune humana contra *Leishmania (V.) guyanensis* antes e após tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®).

✓ Avaliar o padrão de resposta a Intradermoreação de Montenegro (IDRM) e sua utilização como método complementar ao diagnóstico laboratorial da leishmaniose.

### **Capítulo I: Perfil da resposta imune de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis* antes e após tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®)**

✓ Analisar os aspectos clínicos, epidemiológicos e as concentrações de citocinas de perfil  $T_H1$ ,  $T_H2$  e  $T_H17$  em pacientes com leishmaniose cutânea antes do início do tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde.

### **Capítulo II: Concentrações séricas de citocinas em pacientes infectados por diferentes espécies do gênero *Leishmania*.**

## CAPÍTULO I

**Perfil da resposta imune de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis*  
antes e após tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®).**

**Perfil da resposta imune de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis* antes e após tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®).**

**Immune response profile of patients infected by *Leishmania (Viannia) guyanensis* before and after treatment with pentavalent antimony (Glucantime®).**

Thaís T. Espir<sup>1</sup>, Allyson G. da Costa<sup>2</sup>, Luanda de P. Figueira<sup>1</sup>, Maricleide de F. Naiff<sup>1</sup>, João Paulo D Pimentel<sup>3</sup>, Adriana Malheiro<sup>2</sup>, Antonia Maria R. Franco<sup>1</sup>

1. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.
2. Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus, AM.
3. Fundação Oswaldo Cruz- Instituto Leônidas e Maria Deane, Manaus, AM

Fonte de financiamento: FAPEAM, CAPES.

Endereço para correspondência: Dra. Antonia Maria Ramos Franco. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Av. André Araújo, 2.936 - Petrópolis - CEP 69060-001 - Manaus - AM, Brasil. E-mail: afranco@inpa.gov.br

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose causada por flagelados do gênero *Leishmania* e sua patogenia é fortemente influenciada por fatores inerentes ao hospedeiro, como as características genéticas e resposta imunológica; por fatores inerentes ao parasita, como virulência da espécie infectante; e por fatores relacionados ao vetor, como sua capacidade vetorial. Com o intuito de caracterizar a resposta imune de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis* antes e após tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®), foram coletadas amostras de 17 indivíduos infectados e 17 indivíduos sem infecção (controles). Foi realizada análise do perfil celular de linfócitos T e B, células NK, monócitos, células T regulatórias e das citocinas (IL-2, IL-5, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), das imunoglobulinas (IgG e IgM) e Teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM). Os resultados apontam que um amplo espectro de manifestações clínicas pode se desenvolver de acordo com a resposta imune do hospedeiro. Citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e IL-12 apresentaram resultados significativos, com maior concentração nos pacientes antes do início do tratamento; enquanto que menor concentração foi observada para IL-5 no mesmo grupo. Observou-se aumento na relação normal de linfócitos CD4<sup>+</sup> sobre CD8<sup>+</sup>, tanto antes do tratamento como pós-tratamento no grupo infectado. As células NKT apresentaram concentrações marcadamente baixas nos doentes antes do início do tratamento quando comparado aos controles e maior porcentagem de monócitos ativados foi verificada após o término do tratamento e cura clínica da lesão. As concentrações de vários componentes da resposta imune nos doentes variaram frente aos controles e não houve uniformidade no perfil dos pacientes com a mesma doença, sugerindo a presença de resposta T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>17 na infecção por *L. (V.) guyanensis*.

Descritores: Leishmaniose tegumentar americana, resposta imune, *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

## ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a zoonosis caused by flagellates of the genus *Leishmania* and its pathogenesis is strongly influenced by factors inherent to the host, such as genetic factors and immune response, by factors inherent to the parasite, such as virulence of infecting species, and by factors related to the vector, such as vectorial capacity. In order to characterize the immune response of patients infected by *Leishmania (Viannia) guyanensis* before and after treatment with pentavalent antimony (Glucantime®), samples were collected from 17 individuals infected and 17 uninfected individuals (controls). Analysis of cellular profile Cell T and B lymphocytes, NK cells, monocytes, T regulatory cells and cytokines (IL-2, IL-5, IL-5, IL -6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ), immunoglobulins (IgG and IgM) and Montenegro cutaneous test was performed. The results showed that a wide spectrum of clinical manifestations can develop in accordance to the host immune response. Proinflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$  and IL-12 showed significant results with higher concentration in patients prior to initiation of treatment, while lower concentrations were observed for IL-5 in the same group. There was an increase in the normal ratio of CD4<sup>+</sup> to CD8<sup>+</sup>, both before treatment and after treatment in the infected group. NKT cells concentrations were markedly lower in patients prior to initiation of treatment when compared to controls and increased percentage of activated monocytes was observed after the end of treatment and clinical cure of the lesion. The concentrations of various components of immune response in patients compared to the controls varied and there was no uniformity in the profile of patients with the same disease, suggesting the presence T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>17 in response to infection by *L. (V.) guyanensis*.

**KEY WORDS:** American cutaneous leishmaniasis, immune response, *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

## INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete a pele e/ou mucosas (SILVEIRA et al., 2004; 2009). No Brasil, é transmitida pela picada de insetos vetores do gênero *Lutzomyia*. (GONTIJO; CARVALHO, 2003). As características do parasito e da resposta imune do hospedeiro definem as várias manifestações clínicas da infecção, que variam desde formas assintomáticas, lesões cutâneas localizadas ou disseminadas até o acometimento de mucosa nasal ou orofaríngea (SILVEIRA, 2004; MATTA et al., 2009; CHARMOY et al, 2010).

É uma doença parasitária crônica, endêmica em muitas regiões do mundo; 90% de todos os casos ocorrem em apenas sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (ALVAR et al., 2012).

Na Amazônia brasileira, a LTA é causada por sete espécies de leishmanias, seis do subgênero *Viannia*, incluindo *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *L.* (V.) *guyanensis*, *L.* (V.) *lainsoni*, *L.* (V.) *naiffi*, *L.* (V.) *shawi*, *L.* (V.) *lindenbergi* e, uma *L.* (L.) *amazonensis* do subgênero *Leishmania* (SILVEIRA, 2002; 2004).

A resposta imune do hospedeiro mamífero em infecções causadas por *Leishmania* é complexa. Após o repasto sanguíneo do inseto vetor e a introdução dos parasitos no tecido do hospedeiro mamífero, as formas promastigotas metacíclicas encontram um ambiente constituído por componentes do sangue (células e plasma) extravasados para o tecido durante o repasto sanguíneo do inseto vetor. Imediatamente após este contato, há o início da resposta imune natural contra os flagelados, entretanto, as formas infectantes inoculadas no hospedeiro são hábeis para evadir da resposta imune natural. Vários mecanismos têm sido descritos, tais

como: (i) a inativação do sistema complemento, (ii) a modulação da produção de citocinas e quimiocinas, (iii) a interferência nos processos de migração e apoptose celulares e (iv) a modificação do microambiente intracelular para diminuir os efeitos microbicidas dos macrófagos (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento de neutrófilos nesta interação, com a penetração da forma infectante, que após a apoptose destas células e com a migração de macrófagos para o local de inóculo, dá início a resposta imune adquirida (PETERS et al., 2008). De certo modo, as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas pelos macrófagos, resistindo aos mecanismos microbicidas destas células, estando envolvidas diretamente na patogênese da doença. Receptores do tipo Toll como TLR2 (Toll-like receptor 2) presentes nos macrófagos e células NK (Natural Killer) reconhecem moléculas presentes na superfície do parasito, tais como lipofosfoglicano ou LPG e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias de perfil  $T_H1$  (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12) e moléculas co-estimuladoras (CARRADA et al., 2007; DEGROSSOLI et al., 2011).

O papel dos macrófagos é fundamental tanto no estabelecimento da doença como no processo de cura da infecção. Essas células são hospedeiras do parasito, são apresentadoras de antígenos e ativam células T específicas para a resposta imune adquirida. A ativação dos macrófagos através das citocinas de perfil  $T_H1$  (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) resulta na produção do óxido nítrico (NO), que juntamente com o estresse oxidativo representa importante mecanismo de eliminação do parasito (PIRMEZ et al., 1993; BACELLAR et al., 2002; DEGROSSOLI et al., 2011; MCCONVILLE; NADERER, 2011).

O aumento da produção de IFN- $\gamma$  e a diminuição das citocinas como a IL-10 e IL-4 parecem ser necessários para a obtenção da cura clínica da leishmaniose cutânea (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; CASTELLANO et al., 2010). Recentemente, foi relatada uma associação entre os níveis de TNF- $\alpha$ , em culturas de células mononucleares incubadas com

antígeno de *Leishmania*, e a gravidade da LTA na sua forma cutânea localizada (OLIVEIRA et al., 2011).

As citocinas e quimiocinas secretadas por neutrófilos que captam os parasitos de *Leishmania* no início da infecção podem modular o desenvolvimento da resposta imune anti-*Leishmania* (KAYE; SCOTT, 2011; RIBEIRO-GOMES et al., 2012). A presença de citocinas como o TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  parece ser determinante para o controle da disseminação do parasito. No entanto, uma resposta exagerada de perfil T<sub>H</sub>1 tem sido associada a formas mais graves da infecção (BACELLAR et al, 2002; FARIA et al., 2005; CARVALHO et al., 2007).

Quando ocorre o desequilíbrio parasito/hospedeiro no controle da infecção, cria-se então o risco de reativação da doença, produzindo recidivas e possivelmente o surgimento da forma mucosa, anos ou meses após a cicatrização da lesão (BELKAID et al., 2001). Atualmente, não existe nenhuma maneira de prever em quem esta forma mais grave da doença se desenvolverá (SCOTT, 2011) e poucos são os estudos envolvendo a caracterização da resposta imune humana durante processo infeccioso.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar as populações celulares, bem como a concentração de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e de perfil T<sub>H</sub>17 em pacientes com casos confirmados de LC causada por *L. (V.) guyanensis*. Além de correlacionar a resposta aos aspectos clínicos e imunológicos de 17 pacientes com *L. (V.) guyanensis* antes e após tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®), atendidos em uma Unidade Básica de Saúde e no Hospital do município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas. Este estudo representa a primeira avaliação imunológica em pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* na região Amazônica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Tipo de Estudo:

Trata-se de um estudo descritivo, transversal, com coleta de amostras de pacientes diagnosticados com LTA causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* para avaliação da resposta imune celular.

### 2. Área de estudo:

A cidade de Rio Preto da Eva (Figura 01), Amazonas, foi criada na década de 60, servindo de conexão rodoviária entre Manaus e Itacoatiara. Situa-se próximo ao Km 80 da Rodovia AM-010 (3°07'06" S, 59°W), distando 57,5 Km<sup>2</sup> da capital do Estado, fazendo parte da Região Metropolitana de Manaus. A população é formada por 26.948 pessoas e apresenta 5.813 Km<sup>2</sup> de área territorial, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. A cobertura vegetal é de floresta tropical úmida de terra-firme, apresentando grande diversidade de espécies. O clima é tropical com temperatura média anual oscilando em torno dos 26°C, com precipitação pluviométrica superior a 2.000mm/ano e umidade relativa superior a 80% .



Figura 01. Mapa com a localização do município de Rio Preto da Eva-Amazonas-Brasil. Município em destaque no mapa. Fonte: IBGE, 2012.

### 3. Casos clínicos:

Foram incluídos 17 pacientes diagnosticados com LTA, bem como 17 controles negativos na proporção de 1:1 (pareados por gênero e idade). O diagnóstico dos casos suspeitos de leishmaniose foi baseado nos dados epidemiológicos e exame clínico, associados com a positividade de um dos exames laboratoriais. Os pacientes (Figura 02) com suspeita de LTA foram atendidos no Hospital Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão, em Rio Preto da Eva, Amazonas. O estudo foi desenvolvido de acordo com os requisitos do Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96, sendo aprovado pelo comitê

de ética em pesquisas envolvendo seres humanos do INPA sob o número 193/2008 e 006/2010.

#### 4. Critérios de Inclusão e Exclusão:

Os critérios de inclusão utilizados foram: Indivíduos de ambos os sexos, não aparentados, residentes na cidade de Rio Preto da Eva, Estado do Amazonas, com idade entre 18 e 70 anos, que apresentaram sintomas característicos da doença, com tempo de evolução da doença entre 15 e 90 dias, que aceitaram participar do estudo assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) [Anexo I] e que responderam ao questionário padrão (Anexo II). Como critérios de exclusão foram utilizados os seguintes parâmetros: mulheres grávidas, pacientes com história pregressa de infecção ou em tratamento para LTA. Os indivíduos sem infecção (controle negativo) assinaram TCLE específico para esse grupo (Anexo III).

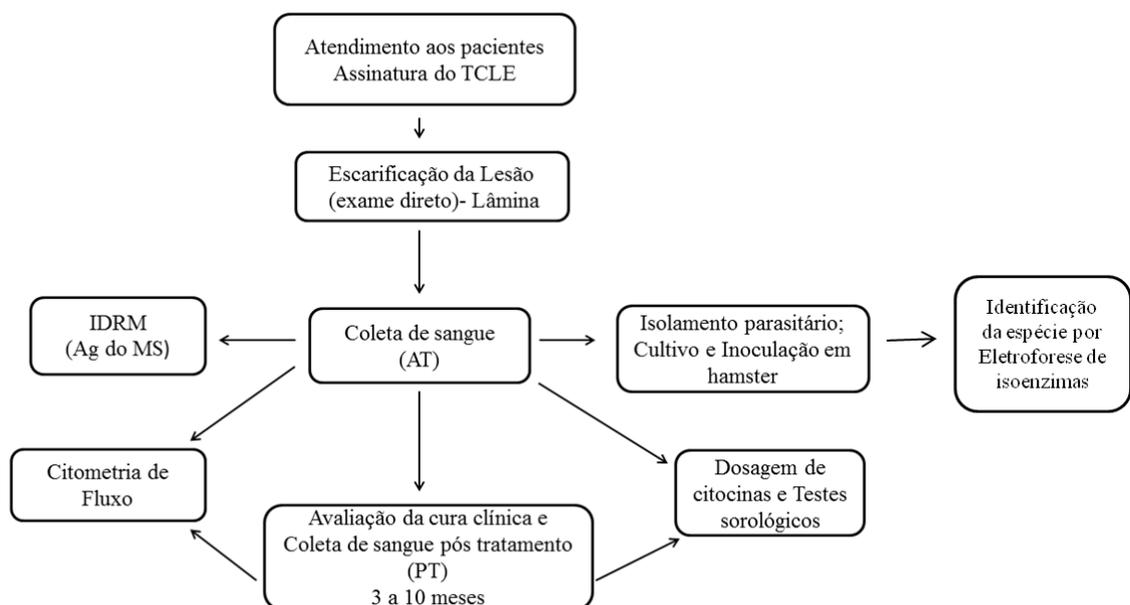


Figura 02. Fluxograma de atendimento dos pacientes. Legenda: TCLE-Termo de consentimento Livre e Esclarecido; AT- antes tratamento; PT- pós-tratamento; Ag do MS- Antígeno do Ministério da Saúde.

## 5. Métodos de diagnóstico:

Todos os pacientes foram submetidos a exame direto por escarificação da borda das lesões cutâneas para pesquisa de amastigotas em lâminas, utilizando-se o kit Panótico (Marca: LB Laborclin) para coloração e analisados por microscopia óptica. O material escarificado da borda das lesões também foi semeado em meio de cultivo bifásico ágar sangue NNN (Neal, Novy, 1904; Nicolle, 1908) e posteriormente expandido em meio líquido completo “Schneider Drosophila Medium” (pH 7,2), contendo 10% de Soro Fetal Bovino inativado (SFBi) para preparo de massa parasitária a ser utilizada na caracterização bioquímica e para a criopreservação dos flagelados em nitrogênio líquido. Também foi realizada a inoculação em animais de experimentação (hamsters/*Mesocricetus auratus*) e reisolamento parasitário após o desenvolvimento das lesões cutâneas.

## 6. Identificação das espécies isoladas:

As cepas isoladas foram caracterizadas pela técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de agarose, conforme protocolo descrito por Cupolillo (1992), utilizando oito sistemas enzimáticos: MalatoDesidrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), IsocitratoDesidrogenase (IDH, E.C.1.1.1.42) com substrato NAD e NADP, Enzima Málica (ME, E.C.1.1.1.40), Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.44), Aconitato Hidratase (ACON, E.C.4.2.1.3) e Hexoquinase (HK, E.C.2.7.1.1). A identificação das espécies foi obtida através da comparação dos perfis isoenzimáticos das amostras com cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533) e *L. (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8).

## 7. Resposta Imune de pacientes infectados com *Leishmania (Viannia.) guyanensis*

### A) Obtenção de amostras de sangue periférico:

Para obtenção das amostras, foram colhidos aproximadamente 12 mL de sangue periférico por punção venosa em tubos com sistema a vácuo, com e sem solução EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer® Juiz de Fora, MG, Brasil) dos pacientes e dos indivíduos sem infecção por leishmania (controle negativo=CN) para realização de Citometria de Fluxo, Dosagem de citocinas e Testes Sorológicos (HIV, HTLV, *Trypanossoma cruzi*) e detecção das imunoglobulinas IgG, IgM e anti-*Leishmania*.

O sangue dos pacientes antes do tratamento (AT) foi colhido no momento em que o mesmo procurava o serviço de saúde com lesão sugestiva de LTA e o sangue pós-tratamento (PT) foi colhido após a confirmação do diagnóstico, caracterização da espécie do parasita e término do ciclo de tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®). A coleta de sangue do PT se deu após cura clínica da lesão e o intervalo do tempo da coleta variou de acordo com o tratamento e disponibilidade de retorno de cada indivíduo no período entre 3 a 10 meses.

### B) Intradermorreação de Montenegro (IDRM):

Foi administrado 0,1mL do antígeno de *Leishmania* (antígeno padrão do Ministério da Saúde; lote: 8015040004) a 3 cm da dobra cubital no antebraço dos indivíduos testados, sendo a induração mensurada após 48 horas para a realização da leitura. O teste foi considerado positivo quando a induração foi maior ou igual a 5mm (milímetros). O teste de IDRM foi disponibilizado pelo Laboratório Central do Estado do Amazonas-LACEN.

### C) Detecção de imunoglobulinas:

#### C.1) Preparo de antígenos solúveis:

Formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) foram cultivadas em meio RPMI (SIGMA-1640), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFBi) [Cultilab, Campinas, BR], 1% de sulfato de gentamicina e 1% de L-glutamina (Gibco BRL-Life Technologies, New York, USA) a 25°C, até atingirem a fase estacionária. Os parasitas ( $10^9$ ) foram colhidos e lavados por centrifugação em solução salina tamponada com fosfato (PBS pH 7,3). Em seguida, foram submetidos a cinco ciclos de congelamento em N<sub>2</sub> líquido (-196°C) e descongelamento em (banho-maria a 37°C). O lisado foi centrifugado a 3.500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi colhido, a concentração protéica determinada pelo método de Bradford (1976) e estocado a -80°C até o momento do uso.

#### C.2) Detecção de Imunoglobulinas (IgG e IgM) por Ensaio Imunoenzimático-ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay):

Placas de poliestireno (Nunc Denmark, Maxi Sorp) com 96 poços foram sensibilizadas com 2,5µg/mL de antígeno em 100µL por poço de Tampão Carbonato (pH 9,6), sendo incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida e, em seguida, lavadas com Solução de Lavagem (SL) contendo 0,05% de Tween-20 e 0,9% de cloreto de sódio NaCl. Posteriormente os sítios remanescentes das placas foram bloqueados com 150µL por poço com Tampão de Bloqueio contendo 2% de leite desnatado e incubadas durante uma hora a TA, sofrendo quatro lavagens posteriores com SL. As amostras de plasma foram adicionadas (100µL por poço, em duplicata) nas diluições de 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 em Tampão de incubação contendo 0,05% de Tween 20 e 0,25% de Leite desnatado e Tampão Carbonato. Após incubação por uma hora a TA, as placas foram lavadas e nelas adicionado o conjugado imunoenzimático (anticorpos policlonais SIGMA) anti-IgG (A- 0293), IgM (A-0420),

produzidos em cabra, ligados à peroxidase, na diluição de 1:40.000, 1:50.000 respectivamente, no volume de 50µL/poço, sendo posteriormente incubadas por uma hora a TA. Em seguida, as placas foram lavadas novamente, sendo adicionado o substrato enzimático contendo orto-fenilenodiamina (OPD) [SIGMA P5412-100TAB] em tampão Citrato de Sódio/ácido cítrico, pH 5 e 4µL de peróxido de hidrogênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (50uL/poço). Após o desenvolvimento da cor por 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4N e a leitura efetuada em leitor de microplaca (BIO TEK) a 492nm de comprimento de onda.

### C.3) Cálculo do limiar de reatividade (“cut-off”):

O “cut-off” foi determinado a partir dos resultados obtidos com as amostras de soros humanos comprovadamente negativos para leishmania em comparação aos de resultados positivos. Foi utilizado o cálculo de média da densidade ótica (DO) das amostras de soros negativos, somado a duas vezes o desvio padrão. Acima dos valores calculados foi considerado como positivo.

### D) Testes Sorológicos:

D.1) Foi realizada sorologia por ELISA seguindo as normas do fabricante para HIV utilizando kit comercial HIV Tetra ELISA (Biotest/Diasorin<sup>®</sup>) lote:D063810, HTLV utilizando kit Murex HTLV-I+II (Abbott<sup>®</sup>) lote:D110910 e para *Trypanosoma cruzi* Teste ELISA Chagas III (BIOSChile<sup>®</sup>) lote: ID120039.

## E) Marcadores Celulares:

## E.1) Imunofenotipagem Celular por Citometria de Fluxo

As células foram obtidas de sangue periférico, coletado em tubo com anticoagulante EDTA. Para a caracterização imunofenotípica, foi realizada a técnica de Citometria de Fluxo.

As células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos (Tab. 01) que se ligam a epítomos específicos que são analisados pelo Citômetro de Fluxo para a caracterização das populações celulares. Neste estudo foi utilizado um painel de anticorpos monoclonais marcados, divididos em sete tubos para a quantificação e caracterização das populações celulares como descrito abaixo:

Tabela 01. Marcação dos anticorpos Monoclonais.

<b>Tubo</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorescência</b>	<b>Clone</b>	<b>Lote</b>	<b>Nº Cat.</b>	<b>Marca</b>	<b>Perfil Celular</b>
<b>01</b>	-	-	-	-	-	-	CN
<b>02</b>	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Linf. T CD4+, CD8+ e Ativação Celular
	Human Anti-CD4	PE	RPA-T4	75982	555346	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD8	FITC	HIT8a	15483	555634	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD69	APC	FN50	68183	555533	<i>BD® Biosciences</i>	
<b>03</b>	Human Anti-CD5	FITC	UCHT2	63832	555352	<i>BD® Biosciences</i>	Linf. B e B1
	Human Anti-CD19	PE	HIB19	66211	555413	<i>BD® Biosciences</i>	
<b>04</b>	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Células NK e NKT
	Human Anti-CD16	FITC	3G8	74331	555406	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD56	PE	B159	67211	555516	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD69	APC	FN50	68183	555533	<i>BD® Biosciences</i>	
<b>05</b>	Human Anti-CD14	FITC	M5E2	60801	555397	<i>BD® Biosciences</i>	Monócitos e Monócitos Ativados
	Human Anti-CD80	PE	L307.4	57050	557227	<i>BD® Biosciences</i>	
<b>06</b>	-	-	-	-	-	-	CN Intracelular
<b>07</b>	Human Anti-CD4	PE	RPA-T4	75982	555346	<i>BD® Biosciences</i>	Linf. Treg
	Human Anti-CD25	FITC	M-A251	66993	555431	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-FoxP3	AF647	259D/C7	68982	560015	<i>BD® Biosciences</i>	

Inicialmente foram incubados 50 $\mu$ L de sangue total nos tubos 1-14 e 200 $\mu$ L nos tubos 15 e 16 com 2  $\mu$ L de cada anticorpo nos seus respectivos tubos. Estes foram homogeneizados e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a marcação, foi feita a lise das hemácias, com o uso da solução de lise (BD FACSTM Lysing Solution, Cat. N<sup>o</sup> 349202, Lot.: 24299, BD<sup>®</sup> Biosciences San Jose, CA, USA), diluída 10 vezes em água destilada. Os tubos foram novamente homogeneizados e incubados por 10 minutos nas mesmas condições. Passada a fase de incubação, os tubos foram centrifugados a 1.300 rpm por 7 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 2 mL de PBS-W (8,0g de NaCl, 1,16g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2g de KCl e 5,0g de BSA, qsp 1L H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,2) para lavagem do pellet formado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados novamente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 300 $\mu$ L de Solução Fixadora (40,0g de HO(CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>OHNaCl, 0,106g de NaOH, 40,04g de C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>AsOONa e 26,6g de NaCl, qsp 200mL de H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,2) nos tubos 1-14, sendo armazenados em geladeira até o momento da leitura.

Aos tubos 15 e 16, foram adicionados 2 mL de PBS-P (8,0g de NaCl, 1,16g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2g de KCl, 5,0g de BSA e 5,0g de Saponina, qsp 1L H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,2) para permeabilização celular. Os tubos foram homogeneizados novamente e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1.300 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentaram-se 2 mL de PBS-W para lavagem do pellet formado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados novamente. Ao término da centrifugação, os tubos foram incubados por mais 30 minutos com PBS-P (tubo 15) e 100  $\mu$ L de anticorpo anti-FoxP3 AF647, diluído (1:10) em PBS-P (tubo 16), complementando o protocolo. Após a incubação, as células foram lavadas com 2 mL PBS-W e centrifugadas. Ao final, o sobrenadante foi

descartado e foram adicionados 300µL de Solução fixadora e armazenadas até o momento da leitura.

A aquisição das amostras foi realizada no Citômetro de Fluxo *FACSCalibur*® (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) da Fundação HEMOAM. Para a identificação morfológica e imunofenotípica das células, foi utilizado o programa *FlowJo* (v9.4) com o auxílio de “gates” para a seleção das populações de interesse em gráficos que combinaram características morfológicas (tamanho e granulosidade) com características imunofenotípicas, através das fluorescências dos anticorpos monoclonais utilizados para identificar as células alvos. Os gráficos utilizados foram do tipo “*dot plot*”, “*contour plot*” e histograma, pois apresentaram uma melhor visualização das estratégias de análise.

#### F) Dosagem e Análise de Citocinas circulantes em sangue periférico:

##### F.1) Dosagem de Citocinas por CBA (Cytometric Bead Array):

A dosagem de citocinas das amostras de soro dos pacientes e controles foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (Cytometric Bead Array) com o Kit BDTM Human  $T_H1/T_H2/T_H17$  Cytokine (Cat. N° 560484, Lot.: 29132, marca BD® Biosciences, San Diego, CA, USA), seguindo as orientações descritas pelo fabricante. As citocinas quantificadas foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL17.

O Kit BDTM CBA utiliza uma série de partículas (microesferas ou beads) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada bead de captura esta conjugada com um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra é realizada através de anticorpos conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a bead. Os complexos formados de bead de captura + citocina da amostra + anticorpo de

detecção são quantificados através da Citometria de Fluxo. A intensidade da Fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM.

Para o cálculo das concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina, foi utilizado o software FCAP-Array™ (v3.0.1).

#### F.2) Dosagem de Citocinas por ELISA:

O teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) foi utilizado para a quantificação das citocinas IL-5, IL-8, IL-12 em soro de pacientes com leishmaniose cutânea e do grupo controle. Foi utilizado o Kit Human BDTM OptEIA® Set II para as citocinas, IL-5 (Cat. N° 555202, Lot.: 79299, marca BD® Biosciences, San Jose, CA, USA), IL-8 (Cat. N° 555244, Lot.: 37391, marca BD® Biosciences, San Jose, CA, USA) e IL-12p70 (Cat. N° 555183, Lot.: 23572, marca BD® Biosciences, San Jose, CA, USA). Foram seguidas todas as recomendações técnicas descritas pelos fabricantes.

As etapas realizadas foram: Impregnação do Anticorpo de Captura em placa de 96 poços *overnight* a 4°C; incubação: por 1 hora a temperatura ambiente com o Diluente de Ensaio, para a reação de bloqueio de ligação inespecífica; 2 horas com a curva padrão e as amostras; 1 hora com o Anticorpo de Detecção (Biotinilado) + Enzima SA<sub>v</sub>-HRP; 30 minutos com o Substrato BD Pharmingen™ TMB Set (Cat. N° 555214, Lot.: 2104750, San Jose, CA, USA); ao final foi adicionado solução de parada e efetuado a leitura.

As etapas de lavagem entre as incubações foram realizadas com a Lavadora Automática de Microplacas Atlantis Microplate Washer (Asys HITECH, Eugendorf, Salzburg, AU). A leitura foi realizada em Leitora Automatizada Expert Plus Microplate Reader (Asys HITECH, Eugendorf, Salzburg, AU), com medição da absorbância de luz a

450nm, para geração das análises e gráficos de correlação logarítmica entre a absorvância e a concentração sérica de cada citocina.

#### G) Análises estatísticas:

As análises estatísticas dos dados da imunofenotipagem dos leucócitos e os níveis séricos das citocinas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 5.0* (San Diego, CA, EUA). Todos os dados foram considerados como apresentando uma distribuição não paramétrica, e, portanto, as análises comparativas entre os grupos foram realizadas por meio da análise de variância ANOVA seguido pelo teste de *Kruskal-Wallis* e *Mann Whitney*. A significância estatística foi definida em ambos os casos em  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Do total de 17 pacientes com primo-infecção para *L. (V.) guyanensis* estudados, 12 (70%) eram do sexo masculino e cinco (30%) do sexo feminino. O tempo de coleta das amostras de sangue periférico variou conforme os pacientes procuravam o serviço de saúde e disponibilidade de retorno após o término do tratamento. A idade dos pacientes variou de 18 a 58 anos (Tab. 02). Presença de atividade na mata foi observada em 100% dos casos e todos os indivíduos relataram ter adquirido a doença em focos rurais, em assentamentos populacionais situados ao longo da Rodovia AM-010 onde ocorrem ciclos de transmissão silvestre.

Dos exames parasitológicos realizados, 83% (14) apresentaram positividade para o exame direto e 100% para o isolamento em meio de cultura bifásico ágar sangue NNN.

Constatou-se que os 17 pacientes desenvolveram lesões cutâneas de aspectos variados. Na observação macroscópica das lesões, verificou-se que seis pacientes (35%) evoluíram com lesões do tipo úlcera franca; cinco casos (29%), com lesões em placa; dois

casos (12%), com lesão nodular, dois casos (12%) com lesão verrucosa, um (6%) de lesão impetigóide e uma (6%) de úlcero vegetante (Figura 03).

Tabela 02. Dados clínico-epidemiológicos de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis* na Unidade Mista de Saúde Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão, Rio Preto da Eva/AM.

Código da Amostra	Sexo	Idade (anos)	Tempo de Infecção (dias)	Intervalo de coleta (PT) (meses)	Nº de lesões	Tamanho da Lesão (mm)	Característica da lesão <sup>+</sup>
MHOM/BR/08/IM5515	M	55	20	07	07	30x20	Em placa
MHOM/BR/09/IM5595	M	21	30	04	01	12x15	Nodular
MHOM/BR/10/IM5637	F	31	60	03	01	17x18	em placa
MHOM/BR/10/IM5653	M	18	90	06	01	30x20	Úlcera franca
MHOM/BR/10/IM5690	F	58	60	10	01	17x18	Úlcero vegetante
MHOM/BR/10/IM5692	F	30	15	06	02	60x60	verrucosa
MHOM/BR/10/IM5694	M	29	14	07	01	20x23	Nodular
MHOM/BR/11/IM5697	M	19	14	03	01	13x16	em placa
MHOM/BR/11/IM5749	M	38	30	03	01	17x14	Impetigoide
MHOM/BR/11/IM5772	M	26	120	04	01	10x08	em placa
MHOM/BR/11/IM5773	M	30	10	10	01	32x21	Úlcera franca
MHOM/BR/11/IM5775	M	24	21	07	04	08x50	Úlcera franca
MHOM/BR/11/IM5828	M	43	150	05	01	11x08	Úlcera franca
MHOM/BR/11/IM5869	M	24	60	03	08	60x60	Úlcera franca
MHOM/BR/11/IM5874	F	23	120	10	01	80x14	Úlcera franca
MHOM/BR/11/IM5875	M	49	30	04	01	11x07	em placa
MHOM/BR/11/IM5976	F	18	21	06	01	17x13	verrucosa

Legenda: Isolados: M- mamífero; HOM- *Homo sapiens*; BR-país de origem (Brasil)/ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA; Sexo: M- masculino; F- feminino. Pacientes que apresentaram mais de uma lesão foi incluído o valor da lesão de maior tamanho.<sup>+</sup>=baseado em NAIFF et al., 2009.

De acordo com a descrição dos pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis*, as lesões haviam surgido no período entre 10 a 120 dias. Em relação aos dados clínico-epidemiológicos, não houve uniformidade quanto ao número de lesões nos indivíduos infectados (variando de uma a oito) e quanto ao padrão, notando-se diferentes características

nas lesões (úlceras francas; impetigóides; lesão em placa; úlcera vegetante; nodular e lesão verrucosa), mesmo sendo a infecção causada pela mesma espécie do parasito (Tabela 02).



Figura 03. Características clínicas (forma cutânea) da leishmaniose tegumentar em Rio Preto da Eva/AM. A: Úlcera franca; B: Impetigóide; C: Lesão em placa; D: Úlcero vegetante; E: Nodular; F: Lesão verrucosa.

Para o teste de IDRM (Tabela 02), a positividade (valores considerados acima de 5mm de endureção) foi de 92% (11 pacientes), um paciente não apresentou resposta ao IDRM representando 5,5% de negatividade e cinco indivíduos não retornaram para leitura do teste no período estipulado (30%). Assim, também não houve uniformidade na resposta a IDRM, que variou entre valores distintos como: fracamente reativos (com valores próximos ao considerado negativo,  $5 \leq 10\text{mm}$ ) reativos ( $>10$  a  $\leq 20$ ) e fortemente reativo ( $>20\text{mm}$ ).

A sorologia para HIV, HTLV e *Trypanosoma cruzi* foi negativa em 100% dos pacientes nas amostras de soros antes do tratamento com antimonial pentavalente.

Tabela 03. Resultados de IDRМ e Imunoglobulinas em pacientes com LTA antes e pós-tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®).

Código das amostras	IDRM (mm)	Título# IgG	Título# IgM
		AT/PT	AT/PT
MHOM/BR/08/IM5515	NR	1:20/1:80	1:80/1:20
MHOM/BR/09/IM5595	11x8	1:160/1:80	1:80/1:40
MHOM/BR/10/IM5637	18x14	1:80/1:40	1:40/1:20
MHOM/BR/10/IM5653	7x6	1:160/1:80	1:20/1:20
MHOM/BR/10/IM5690	20x20	1:160/1:80	1:80/1:20
MHOM/BR/10/IM5692	6x5	1:80/1:40	1:20/1:20
MHOM/BR/10/IM5694	NR	1:160/1:160	1:80/1:20
MHOM/BR/11/IM5697	15x14	1:40/1:80	1:80/1:40
MHOM/BR/11/IM5749	NR	1:40/1:80	1:80/1:40
MHOM/BR/11/IM5772	Negativo	1:20/1:40	1:80/1:40
MHOM/BR/11/IM5773	5x3	1:40/1:160	1:80/1:40
MHOM/BR/11/IM5775	8x4	1:40/1:80	1:80/1:20
MHOM/BR/11/IM5828	27x23	1:40/1:80	1:80/1:40
MHOM/BR/11/IM5869	11x06	1:20/1:80	1:40/1:20
MHOM/BR/11/IM5874	NR	1:80/1:40	1:40/1:20
MHOM/BR/11/IM5875	NR	1:20/1:80	1:40/1:20
MHOM/BR/11/IM5976	17x13	1:40/1:80	1:80/1:40

Legenda: Isolados: M-mamífero; HOM- *Homo sapiens*; BR-país de origem (Brasil)/ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA. IDRМ: Intradermoreação de Montenegro. #Foram considerados positivos de acordo com os valores de Titulação das Imunoglobulinas: IgM $\geq$ 1/20; IgG $\geq$ 1/20.

Quanto a titulação para IgM e IgG, todos os pacientes apresentaram reatividade antes e pós tratamento. Com base nos valores do cut-off foram considerados positivos para IgM títulos  $\geq$ 1/20 e IgG títulos  $\geq$ 1/20. O grupo controle apresentou reatividade de 1/10 em ambas as imunoglobulinas.

Na reatividade antes do tratamento para IgG, a maior titulação foi 1:160 e a menor 1:20, ambas observadas em quatro pacientes (23,5%); a titulação de 1:40 foi encontrada na maioria dos pacientes (AT) representando (35%) da reatividade. Após cura clínica, a variação na titulação de IgG se manteve entre 1:20 a 1:160, mas observou-se que 60% dos pacientes

tiveram o nível de titulação aumentado no pós-tratamento com antimonial pentavalente. A diferença da reatividade da IgG entre os pacientes e controles foi significativa  $p < 0,0001$  (Figura 04).

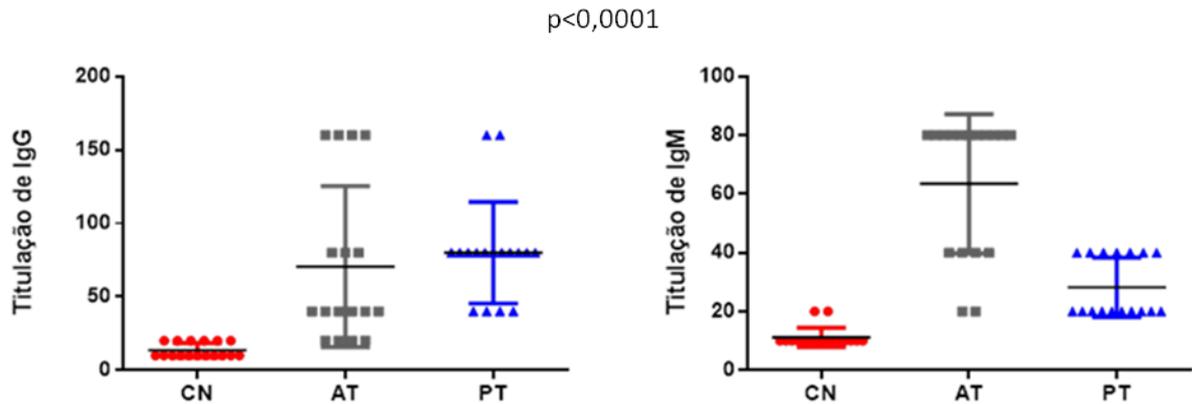


Figura 04. Reatividade de IgG e IgM em amostras do soro de pacientes com Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e população não infectada. São apresentados os resultados individuais e valores médios  $\pm$ desvio padrão (linhas horizontais e verticais). Legenda: CN-controle negativo; AT- antes tratamento; PT- pós-tratamento com antimonial pentavalente.

A análise da reatividade da IgM foi observada em 100% dos pacientes antes e pós tratamento; a titulação de maior predominância no AT foi de 1:80 observada em 11 pacientes (60%) e a menor titulação observada foi 1:20 em dois indivíduos (12%) que apresentaram mesma titulação, tanto em AT como PT. A reatividade para IgM diminuiu consideravelmente em 15 (88%) dos pacientes; tal titulação observada foi de 1:20 (Tabela 03). A reatividade para IgM foi significativa  $p < 0,0001$  quando comparada entre os dois grupos (controles x pacientes) (Figura 04). Na análise comparativa das Imunoglobulinas nos pacientes infectados, observou-se diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) na reatividade entre IgM e IgG pós-tratamento (Figura 05). A titulação de IgG foi maior nas amostras pós-tratamento quando comparada com a

titulação de IgM. Não foi observada diferença significativa na reatividade de IgM e IgG nas amostras antes do tratamento (Figura 05).

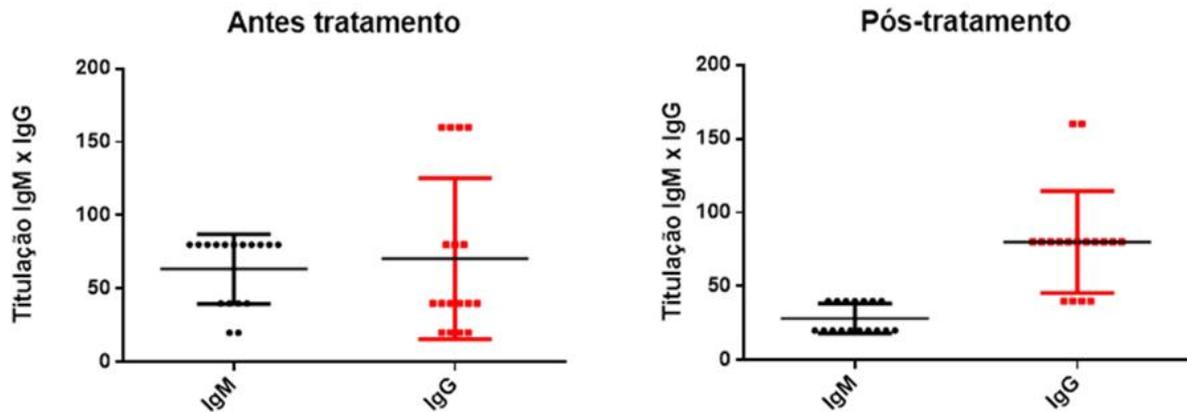


Figura 05. Reatividade de IgG e IgM em amostras do soro de pacientes com Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* antes do tratamento (AT) e pós-tratamento (PT) com antimonial pentavalente. São apresentados os resultados individuais e valores médios  $\pm$  desvio padrão (linhas horizontais e verticais).

Do grupo de pacientes infectados, 41% apresentaram titulações de IgG acima das titulações observadas para IgM nas amostras antes do início do tratamento.

De acordo com os valores de títulos mais elevados para IgG, verifica-se que quatro pacientes (IM5595, IM5653, IM5690, IM5694) comentaram início de sintomas entre 14-90 dias, com lesões nodulares ou ulceradas e lesões únicas. O paciente IM5653 apresentou títulos baixos de IgM e valores mais elevados de IgG, assim como resposta a IDRMs fracamente reativa (7x6 mm). Na figura 06, pode-se observar a diferença na reatividade de IgG e IgM nas amostras antes do tratamento. Embora a concentração da IgM aumente na maioria das amostras estudadas durante fase aguda da doença, nem todas aumentaram uniformemente nos pacientes com infecção pela mesma espécie parasitária. Estas variações nos valores de reatividade das imunoglobulinas, no tamanho da resposta ao teste de IDRMs e as diferentes

apresentações clínicas das lesões, indicam que os componentes da resposta de fase aguda são regulados individualmente.

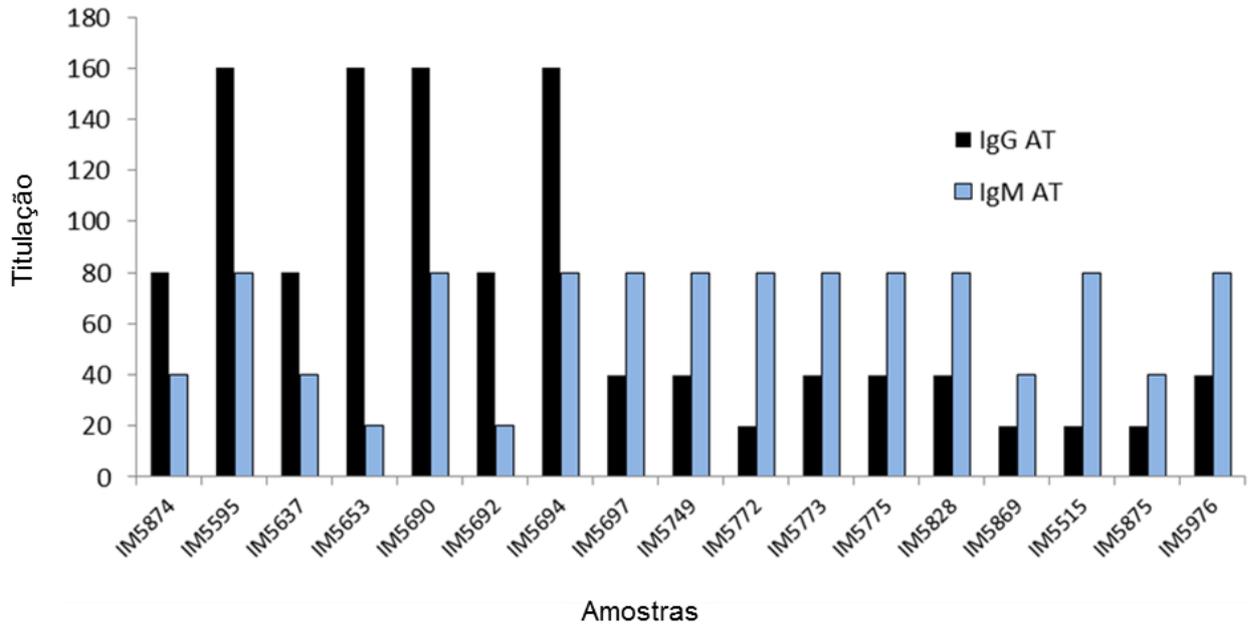


Figura 06. Reatividade de IgG e IgM nas amostras antes do início do tratamento para Leishmaniose Tegumentar Americana.

Nesse estudo, utilizaram-se métodos parasitológicos e imunológicos para diagnóstico da infecção; os resultados são apresentados na Tabela 04. Verificam-se que a reatividade para IgG e IgM utilizando antígeno homólogo de *Leishmania* e o crescimento parasitário no meio de cultivo foi positivo em todos os pacientes analisados.

Tabela 04. Resultado referente à positividade dos métodos de diagnóstico utilizados

Exame direto	Cultivo	IgM	IgG	IDRM*
83%	100%	100%	100%	92%

\*Resultado de IDRM: Fracamente reativo: 34%; Reativo: 50%; Altamente reativo: 8%; Negativo: 8%.

✓ Perfil da Resposta Celular nos pacientes com Leishmaniose cutânea

- Identificação da População de Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Linfócito B (CD19<sup>+</sup>) e B1 (CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>).

A identificação das populações de Linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), Linfócitos B e B1 foi realizada em função do tamanho e granulosidade; e a marcação e seleção, em função dos linfócitos. Primeiramente foi realizado um gráfico de SSC x FSC (Figura07A) e uma “seleção-gate” foi criada na região de linfócitos totais. Em seguida, foram elaborados três gráficos: 1) CD3 PercP x CD4 PE (Figura 07B); 2) CD3 PercP x CD8 FITC (Figura07C); 3) CD19 PE x CD5 FITC (Figura07D) e em seguida foram selecionadas as populações positivas para CD3+/CD4+ (Linfócitos T CD4+), CD3+/CD8+ (Linfócitos T CD8+), CD19+ (Linfócitos B), CD5+/CD19+ (Linfócitos B1).

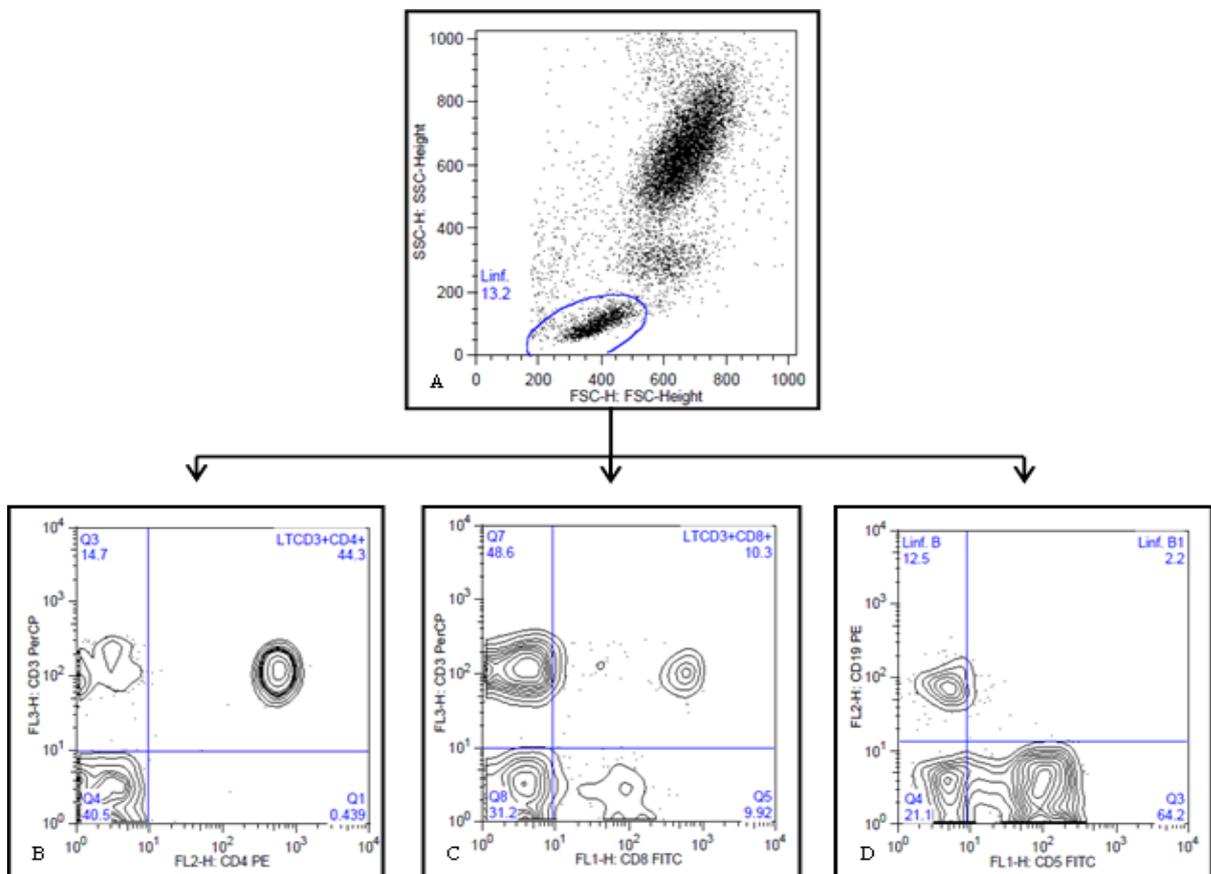


Figura 07. Identificação dos Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Linfócito B (CD19<sup>+</sup>) e B1 (CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) utilizando o programa *FlowJo* (v9.4).

Linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentaram queda nas amostras dos pacientes com *L. (V.) guyanensis* quando comparados com a população controle. Houve diferença significativa no valor de CD8<sup>+</sup> em relação aos não infectados  $p=0,0001$ . Na análise de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, foi observado maior percentual dessa população celular quando comparado com os controles, resultado significativo ( $p=0,0050$ ) [Figura08].

Os linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) e B1 (CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) apresentaram variação nas amostras, enquanto linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) aumentam nas amostras antes do início do tratamento quando comparado aos controles ( $p= 0,0062$ ), os linfócitos B1 (CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) não aumentaram antes do tratamento e sim no pós-tratamento ( $p<0,0001$ ) na comparação com os controles (Figura08).

Na análise entre controles e amostra pós-tratamento foi encontrada diferença significativa na porcentagem de CD8<sup>+</sup> ( $p=0,0002$ ), que apresentou baixa porcentagem desse tipo celular. Comparando somente a população infectada (AT x PT) com antimonial pentavalente foi encontrada diferença apenas nos linfócitos B ( $p=0,0164$ ) e B1 ( $p=0,0005$ ), sendo que B apresenta maior percentual em antes do tratamento; enquanto B1 a porcentagem é maior no pós-tratamento.

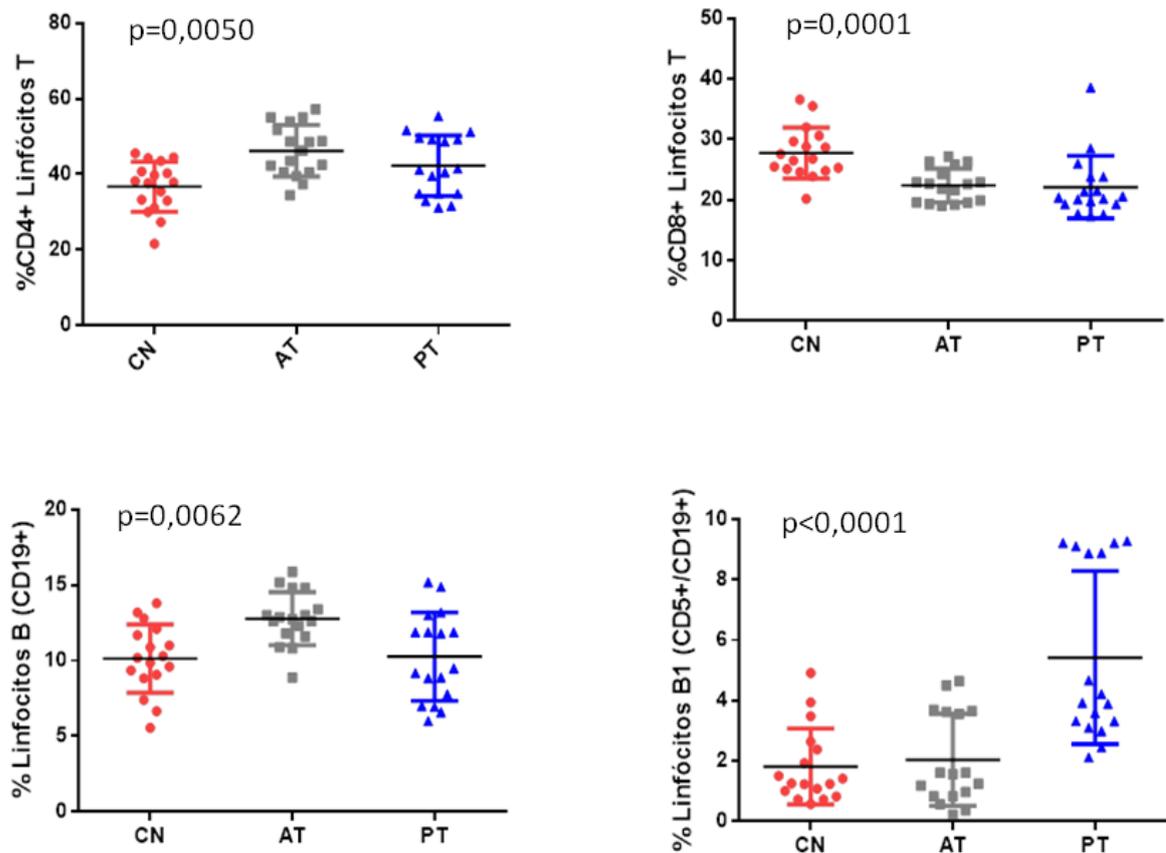


Figura 08. Porcentagem de linfócitos T  $CD8^+$ ;  $CD4^+$  e linfócitos B ( $CD19^+$ ) e  $B1(CD5^+/CD19^+)$  em amostra de sangue periférico de pacientes com infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e população sem infecção. São apresentados os resultados individuais e valores médios  $\pm$ desvio padrão (linhas horizontais e verticais). Legenda: CN: controles negativo; AT: antes tratamento; PT: pós-tratamento com antimonial pentavalente.

- Identificação dos Linfócitos T regulatórios ( $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ ):

A identificação dos linfócitos T regulatórios (Treg) foi feita utilizando-se parâmetros de tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) celular, assim como a identificação de acordo com a fluorescência emitida. Inicialmente fez-se um gráfico de SSC x FSC (Figura09A) e uma seleção foi criada na região de linfócitos totais. Após, foi elaborado gráfico de SSC x CD4 PE (Figura09B), e em seguida foi criado um outro gráfico contendo resultados de CD25 FITC x

FoxP3 AF647 (Figura 09-C) com a população de LTCD4+. A população positiva para CD4+/CD25+/FoxP3+ foi selecionada, caracterizando os linfócitos Treg.

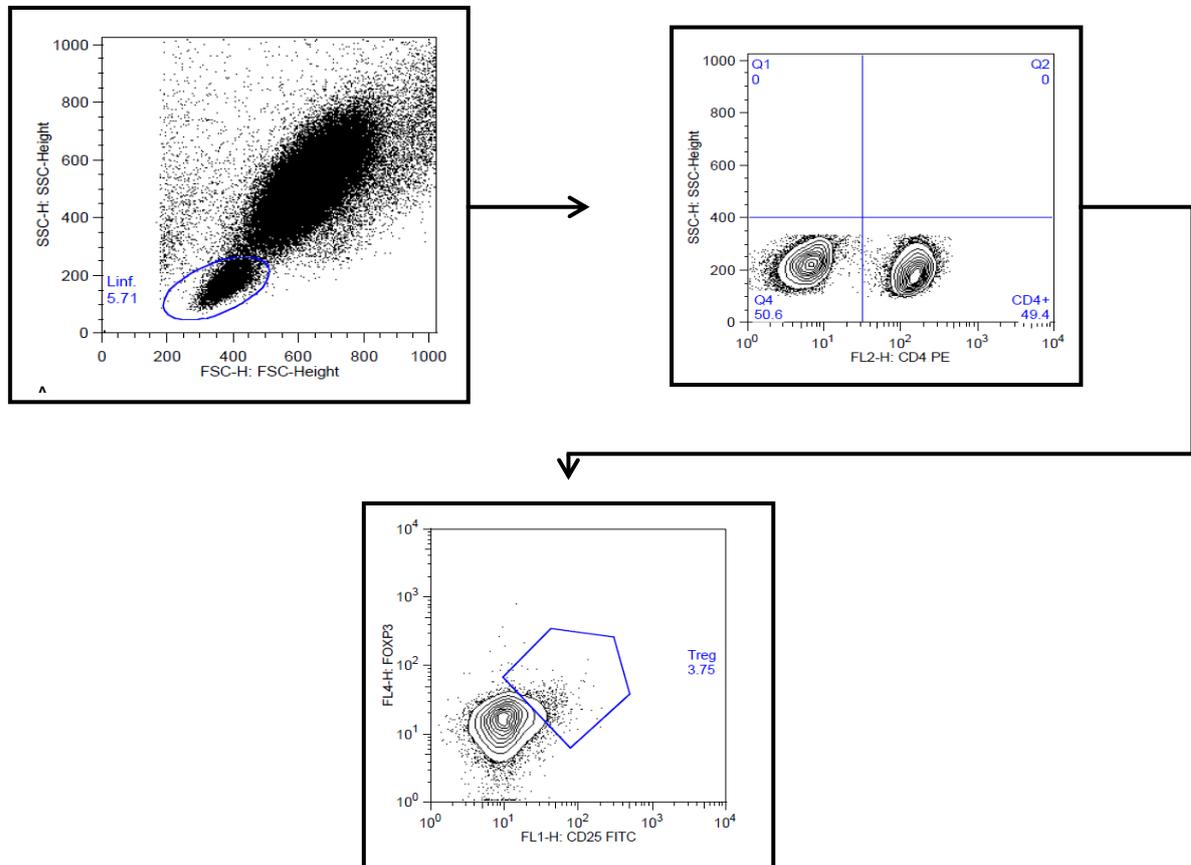


Figura 09: Identificação dos Linfócitos Treg ( $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ ) utilizando o programa *FlowJo* (v9.4).

Na comparação da porcentagem de Treg entre indivíduos infectados e não infectados, foi encontrado  $p=0,0459$  demonstrando diferença significativa entre os dois grupos (Figura 10). A porcentagem de linfócitos T regulatórios foi menor nas amostras antes do tratamento quando comparado aos controles ( $p=0,0445$ ). Também foi observada diferença na análise entre o grupo infectado (AT x PT) com  $p=0,0251$ , demonstrando que no pós-

tratamento a porcentagem de linfócitos tende a aumentar. A análise das amostras após o término do tratamento não apresentou diferença significativo com o observado nos controles.

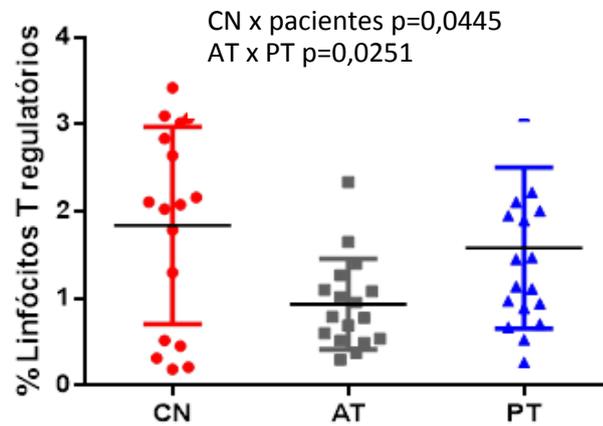


Figura 10: Porcentagem de linfócitos T regulatórios ( $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ ) em amostra de sangue periférico de pacientes com infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e população sem infecção. São apresentados os resultados individuais e valores médios  $\pm$ desvio padrão (linhas horizontais e verticais). Legenda: CN: controles negativo; AT: antes tratamento; PT: pós-tratamento com antimonial pentavalente.

- Identificação das Populações de Células NK ( $CD3^-/CD16^+/CD56^+$ ) e NKT ( $CD3^+/CD16^+/CD56^+$ ):

A identificação das populações de Células NK ( $CD3^-/CD16^+/CD56^+$ ) e NKT ( $CD3^+/CD16^+/CD56^+$ ) foi realizada primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (Figura 11A) e uma seleção foi criada na região de linfócitos totais. Após, foi elaborado gráfico de SSC x CD3 PercP (Figura 11B). Em seguida foram elaborados dois gráficos: 1)  $CD3^-$  e  $CD56$  PE x  $CD16$  FITC (Figura 11C); 2)  $CD3^+$  e  $CD56$  PE x  $CD16$  FITC (Figura 11D). Ao final, foram selecionadas as populações  $CD3^-/CD16^+/CD56^+$  (Células NK) e  $CD3^+/CD16^+/CD56^+$  (Células NKT).

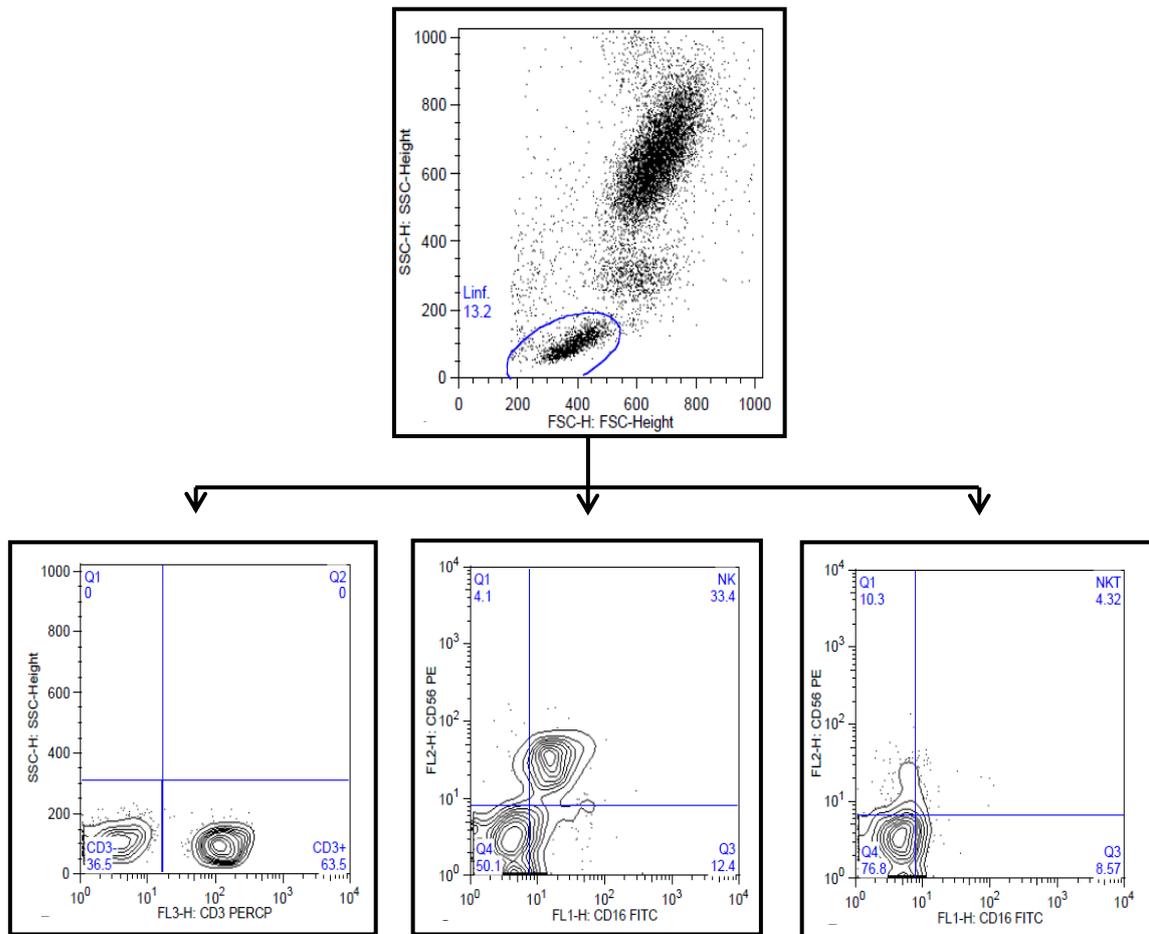


Figura 11. Identificação das Células NK ( $CD3^-/CD16^+/CD56^+$ ) e NKT ( $CD3^+/CD16^+/CD56^+$ ) utilizando o programa *FlowJo* (v9.4).

Na comparação das porcentagens de NK e NKT em (infectados x controles) observou-se diferença significativa nas duas populações celulares  $p=0,0001$  e  $p<0,0001$  respectivamente (Figura 12). No entanto, a porcentagem de NK mesmo apresentando diferença estatística, está muito próxima dos controles.

Comparando apenas amostras antes tratamento com os controles, em ambas populações celulares (NK e NKT) encontrou-se  $p<0,0001$ . A porcentagem de NKT nas amostras AT foi menor na comparação com os controles e tal percentual tende a aumentar no pós-tratamento.

Diferença estatística foi encontrada nas amostras pós-tratamento com relação aos controles negativos ( $p=0,0445$ ) para NK e ( $p=0,0015$ ) para NKT. Na análise da população infectada (AT x PT), somente NKT apresentou diferença estatística significativa  $p=0,0127$ , pois antes do tratamento a queda no percentual dessas células foi brutal quando comparada aos controles e as amostras pós-tratamento.

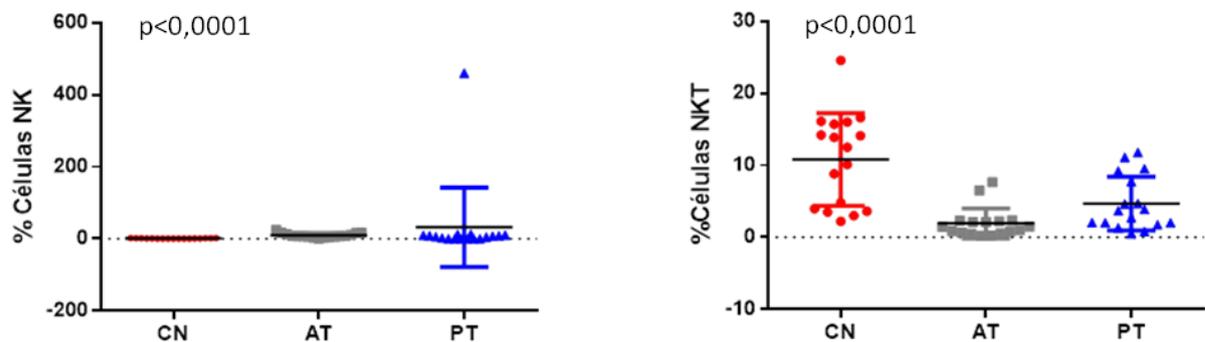


Figura 12. Porcentagem de células NK ( $CD3^-/CD16^+/CD56^+$ ) e NKT ( $CD3^+/CD16^+/CD56^+$ ) em amostra de sangue periférico de pacientes com infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e população sem infecção. São apresentados os resultados individuais e valores médios  $\pm$ desvio padrão (linhas horizontais e verticais). Legenda: CN: controles negativo; AT: antes tratamento; PT: pós-tratamento com antimonial pentavalente.

- Identificação dos Monócitos ( $CD14^+$ ) e Monócitos Ativados ( $CD14^+/CD80^+$ ):

Para a identificação dos monócitos e monócitos ativados, foi realizado um gráfico de SSC x CD14 FITC (Figura 13A) e uma seleção foi feita na região positiva para monócitos ( $CD14^+$ ). Em seguida, foi feito um gráfico e análise de CD14 FITC x CD80 PE (Figura 13B), selecionando a população dupla positiva ( $CD14^+/CD80^+$ ), que são conhecidas como monócitos ativados.

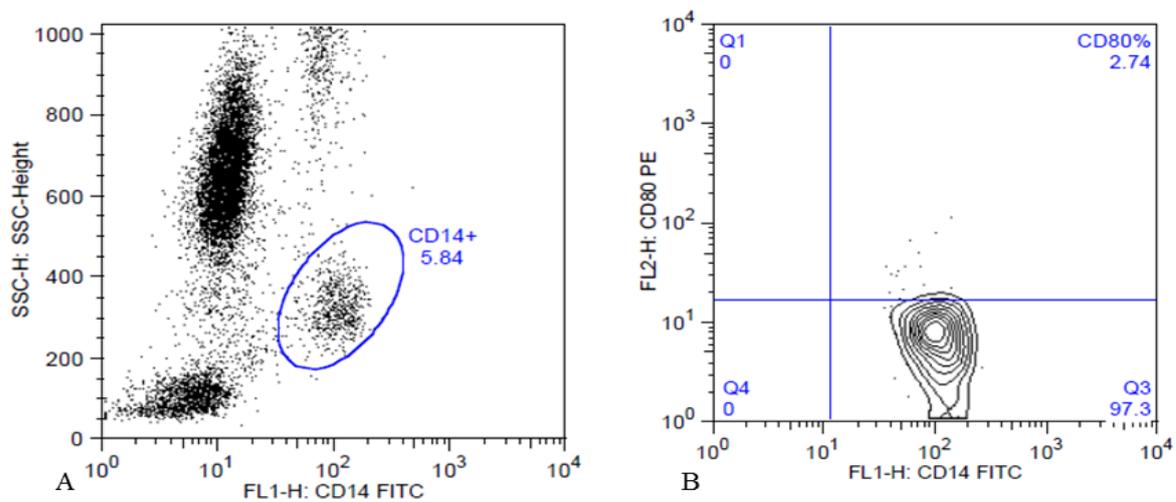


Figura 13. Identificação dos Monócitos ( $CD14^+$ ) e Monócitos Ativados ( $CD14^+/CD80^+$ ) utilizando o programa *FlowJo* (v9.4).

Não foi encontrada diferença significativa na análise comparativa da porcentagem de monócitos ( $CD14^+$ ) entre os grupos controles e infectados ( $p=0,6722$ ) [Figura 14]. Para a porcentagem de monócitos Ativados ( $CD14^+/CD80^+$ ), a diferença foi significativa ( $p=0,0001$ ) na comparação entre controles x infectados; o percentual de monócitos ativados foi maior tanto na amostra antes do tratamento como no pós-tratamento. Curiosamente, os monócitos ativados estão com percentual mais alto nas amostras pós-tratamento quando comparado aos controles ( $p=0,0003$ ) e com amostras antes do tratamento (sem diferença significativa) [Figura 14].

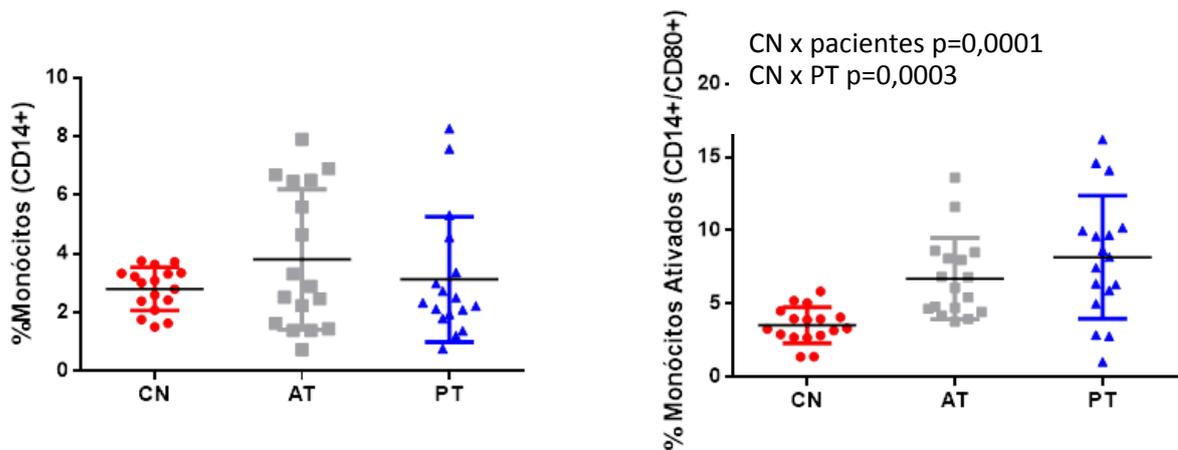


Figura 14. Porcentagem Monócitos ( $CD14^+$ ) e Monócitos Ativados ( $CD14^+/CD80^+$ ) em amostra de sangue periférico de pacientes com infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e população sem infecção. São apresentados os resultados individuais e valores médios  $\pm$ desvio padrão (linhas horizontais e verticais). Legenda: CN: controles negativo; AT: antes tratamento; PT: pós-tratamento com antimonial pentavalente.

✓ Concentração das Citocinas Séricas nos pacientes com Leishmaniose cutânea:

- Citocinas Pró-inflamatórias e de Perfil  $T_H1$

A concentração das citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) entre indivíduos infectados e não infectados (Figura 15). A IL-8 não apresentou diferença significativa entre os dois grupos (infectados x controles) [ $p = 0,6012$ ] e nem entre os pacientes (AT x PT).

Na análise comparativa entre controles e amostras somente antes do tratamento com antimonial pentavalente (AT) as citocinas (IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) apresentaram  $p < 0,0001$ , e maior concentração no grupo infectado foi observado quando comparado ao controle. Na análise estatística comparativa entre controles e amostras pós-tratamento, foi encontrado mesmo p valor ( $p < 0,0001$ ), entretanto, as concentrações nas amostras pós-tratamento tendem a diminuir, mas ainda são maiores quando comparadas aos controle. Ao analisar tais citocinas apenas nas amostras da população infectada (AT x PT), foi observada

diferença estatística somente para IL-12 ( $p=0,0148$ ), que apresentou maior concentração antes do tratamento e sua concentração cai no pós-tratamento se aproximando do que foi encontrado no grupo controle. Não foram observadas diferença significativa nas concentrações séricas de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  entre os pacientes antes ou pós-tratamento.

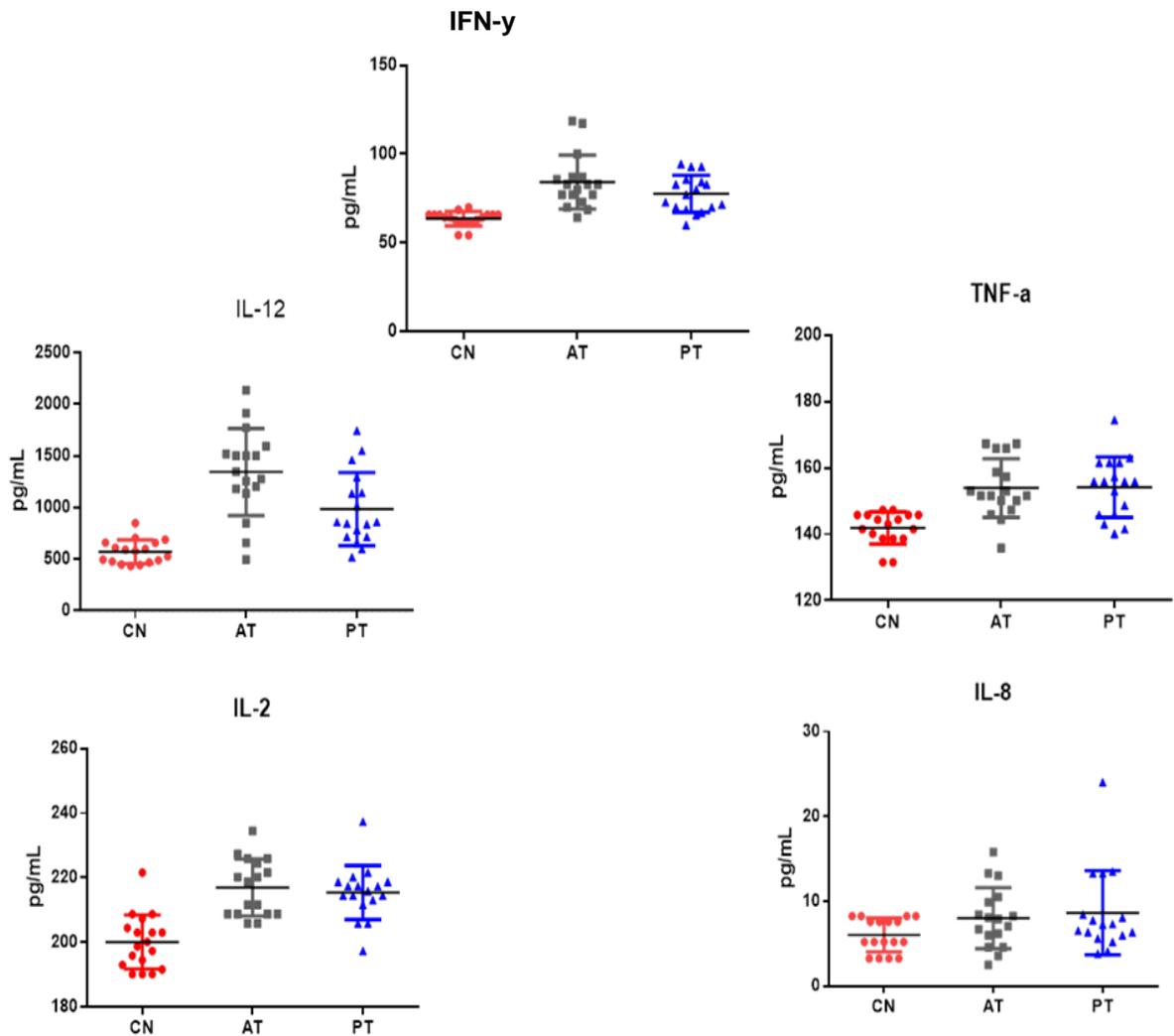


Figura 15. Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e de perfil  $T_H1$  (INF- $\gamma$ , IL1-2, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-8) em amostras do soro de pacientes com Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e população sem infecção (CN). São apresentados os resultados individuais e valores médios  $\pm$ desvio padrão (linhas horizontais e verticais). Legenda: CN-controle negativo; AT: antes tratamento; PT: pós-tratamento com antimônio pentavalente.

- Citocinas Regulatórias e de Perfil T<sub>H</sub>2 e T<sub>H</sub>17:

A citocina regulatória IL-10 apresentou aumento significativo quando comparado aos controles ( $p < 0,0001$  Figura 16). Maior concentração de IL-10 também foi observada nas amostras pós-tratamento quando comparado à população controle.

Diferenças estatísticas significantes foram observadas para as citocinas (IL-4, IL-5, IL-6) [ $p < 0,0001$ ] na comparação com indivíduos não infectados. Entretanto, maior concentração de IL-4 e IL-6 foram observadas nos pacientes, tanto em AT e PT, enquanto que a IL-5 apresentou baixa na sua concentração com relação aos controles. Na análise entre as amostras dos pacientes (AT x PT) apenas a IL-5 apresentou diferença significativa ( $p = 0,0274$ ) notou-se que essa citocina tende a aumentar no pós-tratamento aproximando-se do que foi observado nos controles (Figura 16).

A citocina IL-17 apresentou maior concentração sérica nas amostras dos pacientes em relação aos controles ( $p < 0,0001$ ). Verificou-se que antes do tratamento essa citocina está mais expressa do que no pós-tratamento e que ao término do uso do antimonial pentavalente a concentração de IL-17 apresenta predisposição a reduzir sua concentração (Figura 16).

A Tabela 05 demonstra o perfil da resposta imune frente à infecção por *L. (V.) guyanensis*, entretanto, é importante ressaltar que os resultados apresentados na tabela são relacionados à população controle, visto que a concentração das células, citocinas e imunoglobulinas também apresentaram diferença na comparação das amostras antes do tratamento e pós-tratamento com antimonial pentavalente.

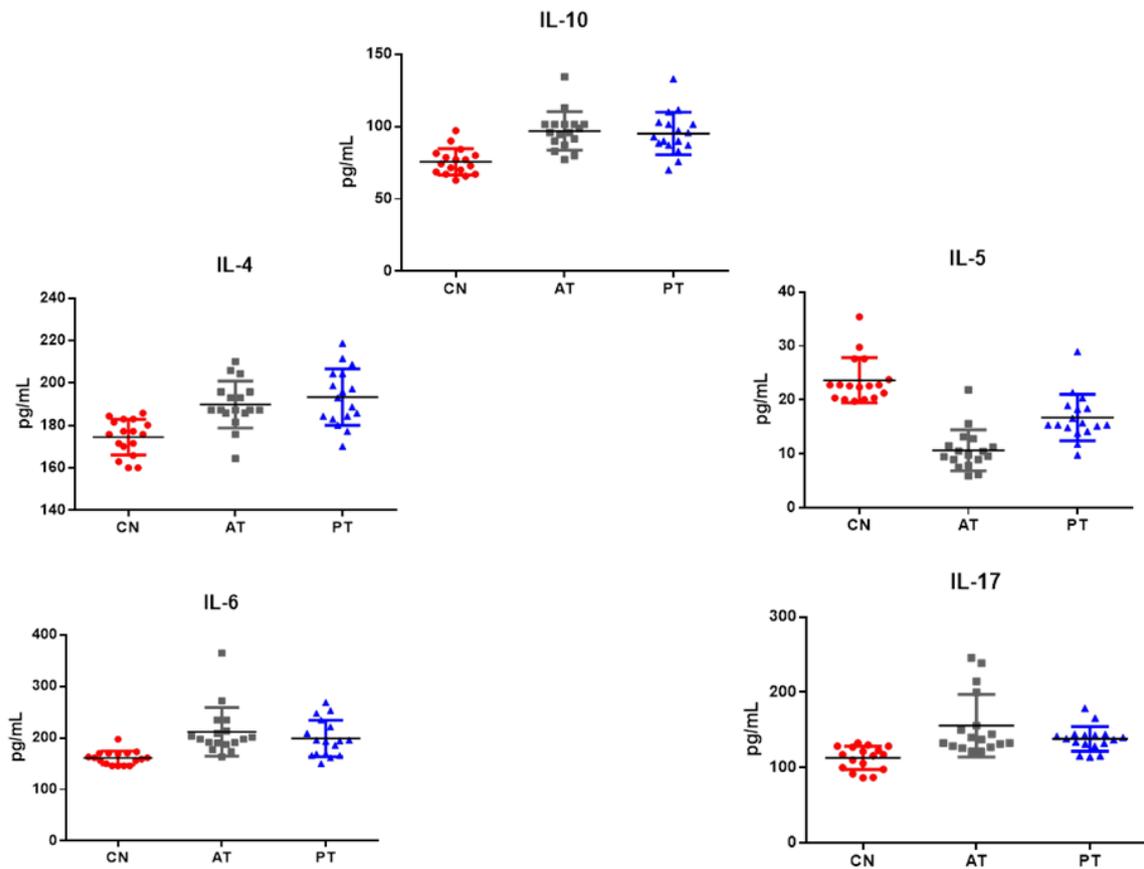


Figura 16. Níveis séricos de citocinas regulatórias e de perfil  $T_H2$  e  $T_H17$  (IL-10, IL-4, IL-5, IL-17) em amostras do soro de pacientes com LTA causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e população sem infecção (CN). São apresentados os resultados individuais e valores médios  $\pm$ desvio padrão (linhas horizontais e verticais). Legenda: CN-controlado negativo; AT: antes tratamento; PT: pós-tratamento com antimonial pentavalente.

Tabela 05. Perfil da Resposta Imune de pacientes com *Leishmania (Viannia) guyanensis* antes e após tratamento com antimonial pentavalente relacionado à população controle.

	AT	PT		AT	PT
CD4+	↑	↑	IL-8	-	-
CD8+	↓	↓	IFN- $\gamma$	↑	↑
LB	↑	-	IL-12	↑	↑
LB1	-	↑	IL-2	↑	↑
Treg	↓	-	TNF- $\alpha$	↑	↑
NK	-	-	IL-10	↑	↑
NKT	↓	↓	IL-4	↑	↑
Mon	↑	-	IL-6	↑	↑
Mon Ativo	↑	↑	IL-5	↓	↓
IgG	+	++	IL-17	↑	↑
IgM	++	+			

Legenda: Análise comparativa entre infectados e população controle (indivíduos sem infecção); ↑ maior concentração frente aos controles; ↓ menor concentração frente aos controles; +: baixa reatividade; ++: alta reatividade; -: não apresenta diferença significativa. AT: Antes do tratamento; PT: Pós-tratamento com antimonial pentavalente.

## DISCUSSÃO

O conhecimento dos fatores relacionados ao parasita e ao hospedeiro humano no curso da LTA tem contribuído para entender a patogênese da doença. O desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora a patógenos intracelulares requer ação coordenada de células da imunidade inata e adaptativa. No presente trabalho, foi demonstrado que diferentes populações celulares e citocinas regulatória e de perfil T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 e T<sub>H</sub>17 estão presentes em infecções causada por *L. (V.) guyanensis*.

Apesar de uma resposta do tipo T<sub>H</sub>1 ser considerada essencial na resolução da LTA, os mecanismos que contribuem para a proteção entre as diferentes espécies não estão bem esclarecidos. Esse estudo é o primeiro a avaliar os diferentes perfis de T helper e populações celulares em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis*.

Após a ativação por patógenos subconjuntos distintos de T<sub>H</sub> podem se diferenciar de acordo com o perfil de citocinas, da ação das moléculas apresentadas pelo antígeno e das células apresentadoras de antígenos (APC) do sistema imune. Células CD4<sup>+</sup> estimuladas podem se diferenciar em células T efetoras, T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>9, T<sub>H</sub>17, com base nos seus perfis de citocinas, as respostas às respectivas quimiocinas, e interações com outras células. Esses subconjuntos de células T podem promover diferentes tipos de respostas inflamatórias. Os subconjuntos mais bem definidos de células T efetoras da linhagem auxiliar de CD4<sup>+</sup> são as células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, sendo o IFN- $\gamma$  a principal citocina de perfil T<sub>H</sub>1 enquanto que IL-4, IL-5 são as citocinas que definem as células T<sub>H</sub>2. (LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2005).

Na infecção por leishmaniose cutânea em estudos experimentais, existe um paradigma T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 para explicar o resultado natural da doença. Nessa infecção os pacientes podem apresentar diferentes formas clínicas com padrão distinto da resposta imune. Clinicamente, os pacientes podem desenvolver úlceras cutâneas únicas ou múltiplas, nodulares, papulares, ou lesões acneiformes (CARVALHO et al., 2012). A espécie do parasito e a resposta imune desempenham papel essencial no curso da infecção, por exemplo, indivíduos infectados por *L. (L.) amazonensis*, podem desenvolver a leishmaniose cutânea disseminada (DCL), uma doença caracterizada pela presença de várias lesões nodulares. Os linfócitos de pacientes com DCL não produzem IFN- $\gamma$  mediante estímulos aos antígenos de *Leishmania* in vitro. No entanto, tal forma cutânea está associada com a proliferação e disseminação do parasito ao longo do corpo destes indivíduos. Diferentemente, os indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis*, podem desenvolver uma forma emergente de

leishmaniose, também com múltiplas lesões, denominada leishmaniose difusa (DL). Nesses indivíduos observa-se elevada produção de TNF e IFN- $\gamma$ , no sangue e tecido, podendo desenvolver lesões ulcerativas com alta taxa de envolvimento da mucosa (MACHADO et al., 2011). No presente estudo verificou-se diferentes formas clínicas da lesão causada por *L. (V.) guyanensis* e maior concentração das citocinas pró-inflamatórias e precursoras de perfil T<sub>H</sub>1 (IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN-  $\gamma$ ) nos pacientes frente aos controles. Algumas dessas citocinas a concentração se manteve ou apresentou leve decréscimo após tratamento com antimonial, ainda que mais elevado que o grupo controle (Fig 15). Tal aumento estimula atividade macrófágica, resultando na produção do óxido nítrico (NO), que juntamente com o stress oxidativo representa importante mecanismo na eliminação do parasito (BACELLAR *et al.*, 2002; DEGROSSOLI, 2011; MCCONVILLE; NADERER, 2011).

Na análise da porcentagem de Monócitos Ativados (CD14<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup>) no curso clínico da LTA nos pacientes desse estudo, verificou-se a diferença significativa entre controles e infectados. Esse grupo celular apresentou maior percentual celular tanto nas amostras antes do tratamento como nas amostras analisadas pós-tratamento e cura clínica da lesão. Na análise comparativa das amostras da população controle x pós-tratamento foi observado maior percentual nos pacientes e diferença estatística significativa entre os dois grupos foi observada, esse achado pode sugerir que a resposta imune com ativação de monócitos/macrófagos para o controle da infecção continua tendo estimulação mesmo após cura clínica da infecção, podendo haver a possibilidade dos pacientes curados clinicamente atuarem como reservatórios do parasito em áreas de transmissão ativa como o caso da Amazônia, tal suspeita foi descrita por diferentes autores na infecção por *Leishmania* do subgênero (*Viannia*) (ZAPH et al., 2004; MENDONÇA et al., 2004; SCOTT, 2005; GOLLOB et al., 2005).

Estudos de vacinas tentando demonstrar a proteção imunológica contra parasitos de *Leishmania* do subgênero (*Viannia*) usando o modelo Murino tiveram sucesso limitado no que diz respeito ao papel do IFN- $\gamma$ , a forte produção de tal citocina em camundongos imunizados não teve sucesso na proteção contra infecção por *L. (V.) braziliensis* (TONUI; TITO 2007; JAYAKUMAR et al., 2011).

Neste trabalho, por se tratar de análises diretamente do sangue periférico de pacientes com LTA e indivíduos sem infecção (controles) as concentrações séricas de IFN-  $\gamma$  foram maiores tanto nas amostras analisadas anteriores ao início do tratamento como nas amostras analisadas após o término do tratamento, pela qual todos os indivíduos já apresentavam cicatrização das lesões. Comparando-se a concentração de IFN- $\gamma$  somente na população infectada (AT x PT) não foi observado diferença significativa. É importante ressaltar que mesmo após o término do tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®) os pacientes apresentaram maior concentração de IFN- $\gamma$  no sangue periférico comparado aos controles. Nesse caso o tempo de coleta de sangue e dosagem de citocinas após o término do tratamento desempenha papel crucial no conhecimento do curso do IFN-  $\gamma$  na infecção. O tempo de coleta no pós-tratamento e dosagem dos níveis séricos variou de 3 a 10 meses nos pacientes estudados, fatores como o número de ciclos do tratamento e disponibilidade de retorno dos indivíduos determinaram o tempo da coleta. Entretanto, independentemente do tempo de coleta do sangue, à concentração de IFN- $\gamma$  foi observada após fim do uso do antimonial pentavalente e cicatrização da lesão, e a mesma se manteve em sua maioria acima do que foi observado no grupo controle.

A resistência do hospedeiro esta associada à ativação de linfócitos CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>1), que secretam citocinas específicas conhecidas como pró-inflamatórias (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ ), contudo, a suscetibilidade a infecção esta relacionada com a resposta de células CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>2), que secretam citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e TGF- $\beta$  e T regulatórias que secretam IL-10.

Deste modo para que ocorra o controle da infecção é necessária à predominância de resposta imune celular envolvendo linfócitos CD4 e CD8, citocinas como a IL-12, IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$ , linfotóxina e algumas quimiocinas produzidas pelos macrófagos. A ausência ou menor resposta T<sub>H</sub>1 favorece a multiplicação e disseminação da *Leishmania* como ocorre nas formas clínicas da Leishmaniose disseminada e na cutâneo-difusa. Nas outras situações ocorre maior controle na multiplicação do parasito, porém há lesão tecidual (BACELLAR et al., 2002; ; SILVA et al., 2007; DEGROSSOLI 2011; CARVALHO et al., 2012).

Na LTA estudos prévios em humanos demonstraram haver uma predominância de linfócitos TCD4 sobre TCD8 no sangue durante a fase ativa da leishmaniose (DA-CRUZ et al., 1994). No presente trabalho foi observada justamente essa predominância de CD4<sup>+</sup> sobre CD8<sup>+</sup> antes e pós-tratamento. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são células do sistema imune adaptativo, capazes de induzir a morte de células infectadas através de mecanismos citotóxicos. Tem-se discutido se os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são responsáveis tanto pela indução de patogênese bem como pela imunidade contra a infecção primária por espécies de *Leishmania*, relacionando sua participação quanto à resolução da infecção, disseminação e número de parasitos e controle da doença (DA-CRUZ et al., 1994).

Embora ambos marcadores tenham apresentado diferença significativa na comparação entre população infectada e controles, p=0,0050 para CD4<sup>+</sup> e p=0,0001 para CD8<sup>+</sup>. Linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentaram menor concentração nas amostras dos pacientes com LTA antes do tratamento com antimonial pentavalente frente aos controles e frente à porcentagem de CD4<sup>+</sup> dos doentes e controles.

Jayakumar et al. (2011) estudando a resposta imune de *Leishmania* do subgênero (*Viannia*) em modelos murinos observaram na mediação da proteção induzida o aumento de Células T CD8<sup>+</sup> sugerindo que tais células são cruciais para o controle da doença e podem

desempenhar um papel crítico no desenvolvimento de vacinas contra parasitas do subgênero *Viannia*.

Novais (2011) realizando estudos em animais experimentais concluiu que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> estão associados ao desenvolvimento da lesão em camundongos infectados por *L. (V.) braziliensis* e são capazes de induzir a disseminação de parasitos em camundongos RAG<sup>-/-</sup> (*Recombination Activating Gene*). O seu envolvimento na patologia foi associado com inibição no recrutamento de neutrófilos e de eosinófilos e ao seu potencial citotóxico.

Nesse não foi verificado diferença significativa na concentração de IL-8, um papel importante dessa citocina é de estimular a migração dos neutrófilos, intensificando a resposta imune nas doenças infecciosas, são sintetizadas por macrófagos e são quimiotáticas para neutrófilos e linfócitos T (BURGMANN et al., 1995). No presente estudo não foi observado diferença significativa na concentração de IL-8 entre pacientes e controles, entretanto, um indivíduo (MHOM/BR/11/IM5773) apresentou aumento na concentração dessa citocina (25,80 pg/mL) na amostra anterior ao início do tratamento e seu tempo de infecção era de 10 dias, tal dado demonstra a ação dessa citocina no início da infecção uma vez que IL-8 esta presente na fase aguda da doença (GABAY; KUSHNER, 2001). Nesse caso o tempo de coleta das amostras antes do início do tratamento pode ser crucial para avaliar o papel dessa citocina durante processo infeccioso na LTA.

Diversos autores (ROBERTS 2006; SILVA et al., 2007 BITTAR et al., 2007; AUDERSET, et al., 2012; BRELAZ-DE CASTRO et al., 2012) acreditam que citocinas como IL-4, IL-10 em razão das ações supressivas nos macrófagos, favorecem a multiplicação do parasita e promovem a exacerbação das lesões, nesse caso, é importante ressaltar que tais informações são obtidas em estudos usando modelo animal como camundongos BALB<sup>-/c</sup> principalmente em espécies de *L. (V.) major* ou *L. (V.) braziliensis*. Nesse trabalho verificou-se que na infecção por *L. (V.) guyanensis* os pacientes estimulam maior concentração de IL-4,

IL-6 e IL-10 comparado aos controles, o mesmo valor p foi encontrado para IL-5, entretanto, a concentração de IL-5 foi muito menor do que os encontrados nos controles. Na avaliação dos níveis séricos de IL-4, IL-6, IL-10 nas amostras antes do tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®) e controles a mesma diferença estatística foi observada. Porém, não foi encontrada diferença significativa ao avaliar a concentração de (IL-4, IL-6 e IL-10) apenas na população infectada (AT x PT).

Bosque et al. (2000) e Bourreau et al. (2001) observaram que infecções do subgênero *Viannia* podem gerar uma resposta hiperinflamatória que não consegue se resolver com um único padrão de citocinas, provocando em seres humanos uma resposta mista de  $T_H1/T_H2$  em infecções por *L. (V.) panamensis*. O mesmo parece ser observado na infecção por *L. (V.) guyanensis* com os resultados verificados nesse trabalho.

Brelaz- de Castro et al. (2012) demonstraram em estudo com antígenos de *L. (V.) braziliensis* uma produção predominante da citocina regulatória (IL-10) e uma produção específica de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  nas amostras de pacientes antes do tratamento. Houve também uma predominância de células T CD4<sup>+</sup> e uma pequena percentagem de células CD8<sup>+</sup>, apresentando na infecção desses pacientes um perfil misto de resposta imunológica. Mostraram que na fase inicial ocorre um decréscimo na modulação de perfil  $T_H1$ , porém as frações antigênicas são capazes de estimular uma resposta específica. Esse estudo está de acordo com o que foi encontrado na infecção por *L. guyanensis*, podendo indicar que *L. braziliensis* e *L. guyanensis* ambas do subgênero *Viannia* desencadeiam resposta imune semelhante no processo infeccioso. Embora a capacidade de montar resposta esteja associada ao controle e cura da infecção, estudos realizados em humanos infectados por *L. braziliensis* demonstraram que a presença de lesões mais agressivas e dano ao tecido estão relacionados à exacerbação da resposta imunológica (LESSA et al., 2001; ANTONELLI et al., 2005). Maiores níveis de IFN- $\gamma$  e TNF-  $\alpha$  foram observados em estudo realizado por Novoa et al.

(2011) com pacientes infectados por *L. braziliensis* residentes de área endêmica quando comparados ao que foi encontrado neste trabalho na infecção por *L. guyanensis*.

Cerca de 3% dos pacientes com lesões cutâneas por *L. braziliensis* podem vir a desenvolver forma mucocutânea (JONES et al., 1987; NOVOA et al., 2011). A *L. (V.) guyanensis* também pode causar a forma mucocutânea ao homem (GRIMALDI et al., 1991; NAIFF et al., 1988;) entretanto, essa porcentagem não está totalmente esclarecida. Segundo Guerra et al. (2011), esta espécie é um agente causador da forma mucosa em diversos pacientes que tiveram a forma cutânea tratada de forma inadequada na região Amazônica. Todavia, o papel da resposta imune nessa forma clínica ainda precisa ser elucidado.

Em áreas endêmicas de *L. (V.) braziliensis* cerca de 10% das pessoas têm a reação de IDRМ positiva, mas não possuem história prévia de LTA ou cicatriz típica da infecção. Estes indivíduos são considerados como tendo uma infecção subclínica e produzem níveis mais baixos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  do que pacientes com forma sintomática da doença (NOVOA et al., 2011). Nesse trabalho o teste de IDRМ apresentou 92% de positividade, dos 12 pacientes que retornaram para leitura do teste, somente um (5,5%) apresentou resultado negativo. É importante ressaltar que muitos pacientes (cinco indivíduos) não puderam retornar para a leitura do IDRМ, demonstrando a dificuldade de utilização desse teste no diagnóstico da LTA na região. Correlação entre os níveis de imunoglobulinas (IgG e IgM) não foi encontrado quando comparado ao tamanho ou número de lesões. Verificou-se que a reatividade ao antígeno de IDRМ apresentou distintos tamanhos de endureção nos pacientes com teste positivo, entretanto, os pacientes que apresentaram forte resposta ao IDRМ apresentavam única lesão com característica ulcerada. O exame direto para detecção do parasita em lâmina apresentou 83% de positividade nos pacientes estudados e mostrou ser um teste útil e relativamente rápido para o diagnóstico da doença.

Machado et al. (2011) verificaram que a sensibilidade dos testes sorológicos em pacientes com infecção cutânea por *L. (V.) braziliensis* é baixa. No entanto, o valor preditivo ao teste de IDRM nessas infecções é alto e isso não parece ser o que ocorre na infecção por *L. (V.) guyanensis*, pois a reatividade aos testes sorológicos também se mostrou alta. Neste trabalho, foi observado 100% de reatividade para IgG e IgM frente ao antígeno homólogo de *Leishmania* e o cultivo parasitário também foi positivo em 100% dos pacientes.

Níveis elevados de IgG e presença de subclasses de IgG1 e IgG3, em pacientes com LC ativa por *L. braziliensis* foi observado por Fagundes-Silva et al. (2012) que detectaram 70% de negatividade nos testes sorológicos para as imunoglobulinas avaliadas após 24 meses da cura clínica. Dados obtidos nesse estudo apontam reatividade de IgG e IgM nos dois períodos analisados (AT e PT) ambas amostras apresentaram significância estatística ( $p < 0,0001$ ). Apesar da variação observada nas titulações dos testes obtidos nas amostras antes do tratamento para IgG em alguns pacientes (IM 5874, IM 5595, IM 5637, IM 5653, IM 5690, IM 5692, IM 5694) que apresentaram maior titulação nesse momento (AT), a grande maioria dos pacientes apresentou maior título de IgG no pós-tratamento, enquanto que a maior reatividade de IgM foi observada nas amostras anterior ao início do tratamento.

Santos-Gomes et al. (2000) observaram que nas lesões ulceradas causada por *L. (V.) braziliensis*, a sensibilidade do ELISA está em torno de 70% no primeiro ano da doença; enquanto que nas lesões por *L. (V.) guyanensis* a sensibilidade é menor e alguns pacientes são persistentemente negativos, esses dados não estão de acordo com o que foi achado nas amostras analisadas nesse estudo, pois até mesmo no período de 10 meses (maior tempo de coleta pós-tratamento dos pacientes desse estudo) detectou-se presença de IgG e IgM.

Escassos são os trabalhos que demonstram a participação de linfócitos B na leishmaniose cutânea. Na investigação de linfócitos B e B1 desse estudo, observou-se relação estatística significativa ( $p = 0,0062$  para B e  $p = 0,0001$  para B1) respectivamente entre

infectados e não infectados. Linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) são anticorpos específicos enquanto que linfócitos B1(CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) são produtores de anticorpos naturais. Mesmo ambos tendo apresentado diferença significativa, verificou-se que linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) aumentaram nas amostras antes do tratamento enquanto que na análise do pós-tratamento essa porcentagem fica muito próximo do que foi observado na população controle. A mesma similaridade não foi encontrada para linfócitos B1 onde a significância estatística se deu no aumento da porcentagem celular das amostras pós-tratamento. Foi demonstrado pela técnica de imunoblot que o reconhecimento das frações antigênicas em soros de pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* é mais baixo e de menor frequência quando comparado com *L. (V.) braziliensis* (MATTA et al., 2009). Menor reatividade de IgG em soros de pacientes com *L. (V.) guyanensis* foi visto pela técnica de imunofluorescência, insinuando uma resposta imune humoral menos efetiva em pacientes infectados por esta espécie do que com *L. (V.) braziliensis*; o que poderia explicar alguns aspectos peculiares da apresentação clínica da LTA cutânea ocasionada por *L. (V.) guyanensis*, como maior número de parasitas nas lesões e maior resistência ao tratamento, contudo neste trabalho, verificou-se alta reatividade de anticorpos ao antígeno de leishmania e maior presença de linfócitos B quando comparado aos controles. Novos estudos devem ser direcionados para compreender o papel dos linfócitos B e da resposta humoral nas infecções por *L. (V.) guyanensis*.

A IL-17 é uma citocina implicada no recrutamento de neutrófilos e a co-localização desta citocina com estes subtipos celulares já foi demonstrada na lesão de pacientes com LM (BOAVENTURA et al., 2010). O papel da IL-17 em infecções parasitárias não está esclarecido, no entanto, as células T<sub>H</sub>17 parecem ter uma forte indução nas doenças autoimunes, no câncer, nas reações inflamatórias ricas em neutrófilos, sendo as mesmas importantes mediadoras de dano tecidual em doenças inflamatórias. (O'QUINN et al., 2008). Verificou-se nesse estudo que a concentração de IL-17 é maior nos indivíduos infectados

quando comparado aos controles negativos. Demonstrando a presença de perfil T<sub>H</sub>17 na fase ativa da LC.

Bacellar et al. (2009) verificaram que IL-17 é produzida durante infecção por *L. (V.) braziliensis*. Os linfócitos obtidos de pacientes com LM e LC, produziram maiores níveis de IL-17 quando comparado aos linfócitos obtidos a partir de indivíduos controles. Houve uma tendência para o tecido obtido a partir de pacientes com a forma mucosa em conter maior número de células que expressam IL-17 em comparação com os tecidos obtidos de pacientes com a forma cutânea, e havia correlação direta entre o número de células que expressam IL-17 e a presença de inflamação celular no local da lesão, confirmando assim o papel dessa citocina na patogênese da reação inflamatória na leishmaniose. Neste trabalho a IL-17 apresentou concentrações elevadas nas amostras antes do início do tratamento, um dos pacientes (MHOM/BR/10/IM5637) que apresentava lesão em placa com presença de filtrado inflamatório teve a concentração sérica de IL-17 (AT) a 245,96 pg/mL (valor mais alto encontrado), detectou-se também que ao comparar os diferentes níveis séricos dessa citocina com relação ao tempo de infecção a mesma não apresentou diferença estatística na comparação entre os AT x PT. No entanto, na análise da concentração do grupo controle e infectados, os níveis séricos apresentaram diferença tanto nas amostras antes do tratamento como pós-tratamento com relação aos controles. Pode-se pensar que a liberação de IL-17 tem sido estimulada no curso clínico da doença, mas também após cura clínica e cicatrização da lesão. Alguns autores sugerem que células de T<sub>H</sub>17 na LC causada por *L. major* podem contribuir para o agravamento da doença, criando um ambiente inflamatório no local da infecção que leva ao recrutamento de granulócitos (KOSTKA et al., 2006; BARTH et al., 2012). Contudo, seu papel no processo infeccioso na LC precisa ser ainda esclarecido.

As células T reguladoras (Tregs) desempenham um papel importante na regulação da resposta imune, controlando a infecção e exacerbação da resposta, mas ao mesmo tempo

regulam o sistema impedindo a cura estéril no intuito de impedir a reativação da doença. Estudo realizado com *L. braziliensis* em camundongos BALB / c por Falcão et al. (2012) investigou o papel dessas células no curso clínico da doença e observaram a presença CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> e Foxp3 na infecção primária. Curiosamente, uma inoculação secundária com *L. braziliensis* não impediu o desencadeamento de nova infecção nos camundongos curados. Esses dados mostram que durante infecção experimental, Tregs estão presentes em camundongos curados, mas esta população celular não impede o surgimento de nova infecção. Ao avaliar a porcentagem de células Treg (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>) em pacientes com infecção por *L. guyanensis* foi observado diferença estatística significativa quando comparado aos controles. Nas amostras de sangue periférico avaliadas antes do tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime ®) a percentual desse grupo celular foi menor quando comparado a população sem infecção. A comparação da porcentagem de Treg nos pacientes (AT x PT) também apresentou diferença estatística significativa demonstrando que ao término do tratamento esse grupo celular tende a aumentar e se aproximar ao que foi observado nos controles. Tal achado pode sugerir que essas células estão sendo suprimidas na fase aguda da doença, pois assim que ocorre a cura clínica as células Treg tendem a retornar aos níveis observados nos controles.

Infecções por parasitas do gênero *Leishmania* levam a uma ativação rápida e transitória de células NK. A ativação das células NK em camundongos requer a presença de receptores Toll-like e estimulação das células dendríticas (DC), sendo seguido pela presença de IL-12 (BOGDAN, 2012). Embora as células NK pareçam não ser essenciais para o controle final da leishmaniose cutânea e podem apresentar funções imunossupressoras, elas desempenham papel importante na produção de IFN- $\gamma$  que induzem atividade leishmanicida dos macrófagos e ajudam a preparar uma resposta de células T<sub>H</sub>1 protetoras (BOGDAN, 2001; STETSON et al., 2003 ; LAOUAR et al., 2005,. PRAJEETH et al., 2011). Entretanto, a

atividade citotóxica das células NK é dispensável porque células mielóides infectadas por *Leishmania* são largamente resistente à lise mediada por NK (BODGAN, 2012). No presente estudo foram avaliadas as porcentagens de Células NK ( $CD3^-/CD16^+/CD56^+$ ) e NKT ( $CD3^+/CD16^+/CD56^+$ ) em pacientes com leishmaniose cutânea. Apesar de ambas as populações celulares apresentarem resultados significativos (NK  $p=0,0001$  e NKT  $p<0,0001$ ) na comparação entre pacientes e controles, foi observado pouco aumento de células NK nas amostras pós-tratamento e nenhuma diferença na porcentagem de NK entre AT e CN. Já a porcentagem de NKT foi consideravelmente menor em AT e PT na comparação com os controles negativos. A função das diferentes subpopulações de células NKT no sangue periférico humano, ainda não são bem compreendidas, no entanto, as células NKT possuem diversas características das células T da imunidade adaptativa.

As NKT são divididas em subgrupos distintos: os fenótipos  $CD4^+$  e  $CD4^-$  em camundongos e humanos, e  $CD8^+$  e  $CD4^-CD8^-$  em humanos. Após estímulo, as NKT secretam citocinas  $T_H1$  e  $T_H2$  (GODFREY et al., 2000). A frequência das NKT representa menos de 1% da população de linfócitos T no sangue periférico humano (EMOTO et al., 1999). Os resultados deste estudo sugerem que vários fatores podem alterar a quantidade das células NKT na infecção por *L. (V.) guyanensis* e mais estudos devem ser endereçados para esclarecer melhor estes fatos e a importância de NKT na LC causada por esta espécie e sua participação na secreção de citocinas pró-inflamatórias, regulatórias e de perfil  $T_H17$ .

Bodgan (2012) apresentou importância funcional das células NK na leishmaniose cutânea; (1) inibição ou ativação direta de células NK por formas promastigotas de *leishmania*, (2) a supressão do número de células NK ou atividade durante as infecções crônicas e não curadas e (3) a recuperação da atividade das células NK após o tratamento. Os dados descobertos estão de acordo com o que foi apresentado pelo autor.

Independente de saber se as células NK são essenciais ou não para o controle da LC em humanos, existem evidências que tais células desempenham em modelo experimental papel importante na ativação de IFN- $\gamma$  mediada por macrófagos e desenvolvimento de células T<sub>H1</sub> e efeitos benéficos foram associados com a ativação das células NK em camundongos infectados por *L. major* e *L. amazonensis* (LAOUAR et al., 2005; BODGAN 2012). Várias abordagens têm sido testadas em LC experimental para estimular a atividade das células NK a fim de melhorar o curso da infecção ou para atuar na produção de vacinas (REMER et al., 2010).

Concluimos com os resultados obtidos a existência de perfil misto da resposta imune (T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub> e T<sub>H17</sub>) na infecção por *L. (V.) guyanensis*, com presença de sinais pró-inflamatórios e regulatórios. O tempo da infecção e o tempo da coleta do sangue periférico pós-tratamento na análise do perfil da resposta imunológica desencadeada na LC parece ter papel importante nos resultados encontrados. Estes dados sugerem que a cura clínica com cicatrização das lesões pode não coincidir com a cura parasitológica, visto que, a resposta imune continua sendo estimulada mesmo após término do tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®) e fechamento da lesão. Presença de DNA do parasito e parasitos viáveis em cicatriz de lesão já foi observada em infecções por *L. (V.) braziliensis* (ANDRADE et al., 2005; PAIVA CAVALCANTI et al., 2013) e por *L. (V.) guyanensis* (NOGUEIRA, 2009 resultados não publicados). No entanto, tais achados podem indicar um perfil imunológico menos exacerbado quando comparado com *L. (V.) braziliensis* possivelmente porque infecção por *L. (V.) guyanensis* parece sugerir a existência de um perfil misto de resposta imune (T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub>). As células T e seus mediadores têm um papel fundamental na resposta do hospedeiro à *Leishmania (Viannia) guyanensis* existindo assim grande procura por marcadores da infecção que possam indicar o processo de cura em formas cutâneas da LTA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALVAR, J.; VELEZ, DI.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN, BOER. M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence the WHO Leishmaniasis Control Team. *PLoS ONE*, v. 7, May. 2012.
02. ANDRADE MS, BRITO ME, SILVA ST, LIMA BS, ALMEIDA EL, ALBUQUERQUE EL, MARINHO JÚNIOR JF, ISHIKAWA E, CUPOLILLO E, BRANDÃO-FILHO SP. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in military training area of Zona da Mata in Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. May-Jun;38(3):229-33. 2005
03. ANTONELLI, LR.; DUTRA, WO.; ALMEIDA, RP.; BACELLAR, O.; CARVALHO, EM.; GOLLOB, KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett*. Nov 15;101(2):226-30, 2005.
04. AUDERSET, F.; SCHUSTER, S.; COUTAZ, M.; KOCH, U.; DESGRANGES, F.; MERCK, E.; MACDONALD, HR.; RADTKE, F.; TACCHINI-COTTIER, F. Redundant Notch1 and Notch2 signaling is necessary for IFN $\gamma$  secretion by T helper 1 cells during infection with *Leishmania major*. *PLoS Pathog*. 8(3):e1002560, 2012.
05. AWASTHI, A.; MATHUR, RK.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*. Jun; 119(6):238-58, 2004.
06. BARTH, T.; SCHMIDT, D.; BOTTERON, C.; NGUYEN, TT.; RITTER, U.; MÄNNEL, DN.; LECHNER, A. An early reduction in Treg cells correlates with enhanced local inflammation in cutaneous leishmaniasis in CCR6-deficient mice. *PLoS One*. 7(9):e44499, 2012.
07. BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO, DE; JESUS, A.; DUTRA, WO.; GOLLOB, KJ.; CARVALHO, EM. Up-regulation of Th1-type responses

- in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 12, pp. 6734–6740, 2002.
08. BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin 8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 55:97-179, 1994.
09. BITTAR, RC.; NOGUEIRA, RS.; VIEIRA-GONÇALVES, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; MATTOS, MS.; OLIVEIRA-NETO, MP.; COUTINHO, SG.;; DA-CRUZ, AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Aug;102(5):625-30, 2007.
10. BOAVENTURA VS, SANTOS CS, CARDOSO CR, DE ANDRADE J, DOS SANTOS WL, CLARÊNCIO J, SILVA JS, BORGES VM, BARRAL-NETTO M, BRODSKY CI, BARRAL. A Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol.* Oct;40(10):2830-6, 2010.
11. BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2:69, 2012.
12. BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2, 907–916. doi: 10.1038/ni1001-907, 2001.
13. BOSQUE, F.; SARAVIA, NG.; VALDERRAMA, L.; MILON, G. Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scand J Immunol.* May;51(5):533-41, 2000.
14. BOURREAU, E.; PREVOT, G.; PRADINAUD, R.; LAUNOIS, P. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12. *J Infect Dis.* 183:953–959, 2001.

15. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2007. 2ª Edição. 182p. Ed. Ministério da Saúde. Disponível em: ([http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_lta\\_2ed.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf)). Acesso em: 31\07\2013.
16. BRELAZ-DE-CASTRO, MC.; DE; ALMEIDA, AF.; DE; OLIVEIRA, AP.; DE; ASSIS-SOUZA, M.; DA; ROCHA, LF.; PEREIRA, VR. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol.* Oct;279(2):180-6, 2012.
17. BURGMANN H, HOLLENSTEIN U, WENISCH C, THALHAMMER F, LOOAREESUWAN S, GRANINGER W. Serum concentrations of MIP-1 alpha and interleukin-8 in patients suffering from acute Plasmodium falciparum malaria. *Clin Immunol Immunopathol.* Jul; 76(1 Pt 1):32-6, 1995.
18. CHARMOY, M.; AUDERSET, F.; ALLENBACH, C.; TACCHINI-COTTIER, F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol.* 719361, 2010.
19. CARRADA, G.; CAÑEDA, C.; SALAIZA, N.; DELGADO, J.; RUIZ, A.; SANCHEZ, B.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L.; AGUIRRE, M.; BECKER, I. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol.* Mar; 29(3):117-26, 2007.
20. CARVALHO, LP.; PASSOS, S.; CARVALHO, EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in Immunology* 3:301, 2012.
21. CARVALHO, LP.; PASSOS, S.; BACELLAR, O.; LESSA, M.; ALMEIDA, RP. et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol.* 29:251–258, 2007.

22. CASTELLANO, LR.; GAVE, TC.; LIRA, MA.; DESSEIN, H.; DESSEIN, A.; CORREIA, D.; RODRIGUES, V. Evaluation of electro-eluted antigens in the serological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* Jun;104(4):347-50, 2010.
23. DA-CRUZ, AM.; BITTAR, R.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, MP.; NOGUEIRA, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; AZEREDO-COUTINHO, RB.; COUTINHO, SG. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* Mar;9 (2):251-6, 2002.
24. DA-CRUZ, AM.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; BERTHO, AL.; COUTINHO, SG. *Leishmania*-reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* Jun;62(6):2614-8, 1994.
25. DA-CRUZ, AM.; OLIVEIRA-NETO, MP.; BERTHO, AL.; MENDES-AGUIAR, CO.; COUTINHO, SG. T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. *J Invest Dermatol.* May;130(5):1329-36, 2010.
26. DAVIES, PD. The world-wide increase in tuberculosis: how demographic changes, HIV infection and increasing numbers in poverty are increasing tuberculosis. *Ann Med.* 35(4):235-43, 2003.
27. DEGROSSOLI, A.; ARRAIS-SILVA, WW.; COLHONE, MC.; GADELHA, FR.; JOAZEIRO, PP.; GIORGIO, S. The influence of low oxygen on macrophage response to *Leishmania* infection. *Scand J Immunol.* Aug;74(2):165-75, 2011.
28. EMOTO M, MITTRÜCKER HW, SCHMITS R, MAK TW, KAUFMANN SH. Critical role of leukocyte function-associated antigen-1 in liver accumulation of CD4<sup>+</sup>NKT cells. *J Immunol.* May 1;162(9):5094-8. 1999.
29. FAGUNDES-SILVA, GA.; VIEIRA-GONCALVES, R.; NEPOMUCENO, MP.; DE; SOUZA, MA.; FAVORETO, S. JR.; OLIVEIRA-NETO, MP.; DA-CRUZ, AM.; GOMES-SILVA, A. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion

- healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol.* Oct;34 (10):486-91, 2012.
30. FARIA, DR.; GOLLOB, KJ.; BARBOSA, J. JR. et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun.* 73:7853–9, 2005.
31. FARIA, DR.; SOUZA, PE.; DURAES, FV. et al. Recruitment of CD8(  $\beta$  ) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 31:432–9, 2009.
32. FALCÃO, CS.; DE; MOURA, TR.; CLARÊNCIO, J.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A.; DE; OLIVEIRA, CI. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. *Int J Parasitol.* Jul;42(8):771-80, 2012.
33. FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; BACELLAR, O. et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis.* 34: E54–58, 2002.
34. GABAY C; KUSHNER I. Acute-phase Proteins. *Encyclopedia of life Sciences*, 2001.
35. GODFREY DI, HAMMOND KJ, POULTON LD, SMYTH MJ, BAXTER AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today.* Nov;21(11):573-83. 2000.
36. GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p.71-80, Jan-Feb; 2003.
37. GOMES-SILVA, A.; DE; CASSIA, BITTAR, R.; DOS; SANTOS, NOGUEIRA, R.; AMATO, VS.; DA; SILVA, MATTOS, M. et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol.* 149:440–444, 2007.

38. GRIMALDI, G. JR.; MOMEN, H.; NAIFF, RD.; MCMAHON-PRATT, D.; BARRETT, TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* Jun;44(6):645-61., 1991.
39. GUERRA, JAO.; COELHO, LIRC.; PEREIRA, FR.; SIQUEIRA, AM.; RIBEIRO, RL.; MIRANDA, T. L. et al American Tegumentary Leishmaniasis and HIV-AIDS Association in a Tertiary Care Center in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 85(3), pp. 524–527, 2011.
40. GOLLOB, KJ.; ANTONELLI, LR.; DUTRA, WO. Insights into CD4+ memory T cells following *Leishmania* infection. *Trends Parasitol.* Aug;21(8):347-50, 2005.
41. JAYAKUMAR, A.; CASTILHO, TM.; PARQUE, E.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; BLACKWELL, JM.; MCMAHON-PRATT, D. TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T Cell responses providing protection against *Leishmania (Viannia)*. *PLoS Negl Trop Dis.* Jun; 5(6):e1204, 2011.
42. JONES, TC.; JOHNSON, WD. JR.; BARRETTO, AC.; LAGO, E.; BADARO, R.; CERF, B.; REED, SG.; NETTO, EM.; TADA, MS.; FRANCA, TF. et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect* Jul;156(1):73-83, 1987.
43. KOSTKA, SL.; KNOP, J.; KONUR, A.; UDEY, MC.; VON, STEBUT, E. Distinct roles for IL-1 receptor type I signaling in early versus established *Leishmania major* infections. *J Invest Dermatol.* Jul;126(7):1582-9, 2006.
44. KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* Jul 11;9(8):604-15, 2011.
45. KELLY-WELCH, AE.; HANSON, EM.; BOOTHBY, MR.; KEEGAN, AD. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science.* 300:1527-8, 2003.

46. LAOUAR, Y.; SUTTERWALA, FS.; GORELIK, L.; FLAVELL, RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol.* Jun;6(6):600-7, 2005.
47. LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Opinion Immunology.* Jun;17(3):326-32, 2005.
48. LESSA, HÁ.; MACHADO, P.; LIMA, F.; CRUZ, AA.; BACELLAR, O.; GUERREIRO, J.; CARVALHO, EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg.* Aug;65(2):87-9, 2001.
49. LOPEZ, KOSTKA, S.; DINGES, S.; GRIEWANK, K.; IWAKURA, Y.; UDEY, MC. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol.* 182: 3039–3046, 2009.
50. MACHADO, PR.; CARVALHO, AM.; MACHADO, GU.; DANTAS, ML. ArrudaS. Development of cutaneous leishmaniasis after leishmania skin test. *Case Rep Med.* 631079, 2011.
51. MATTA, NE.; NOGUEIRA, RS.; FRANCO, AM.; DE, SOUZA, E.; SOUZA, I.; MATTOS, MS.; OLIVEIRA-NETO, MP. et al. *Leishmania (Viannia) guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:339-44.
52. MARZOUKI, S. BEN.; AHMED, M.; BOUSSOFFARA, T.; ABDELADHIM, M. BEN.; ALEYA-BOUAFIF, N.; NAMANE, A.; HAMIDA, NB. BEN.; SALAH, A.; LOUZIR, H. Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* May;84(5):653-61, 2011.
53. MARZOUKI, S.; ABDELADHIM, M.; ABDESSALEM, CB.; OLIVEIRA, F.; FERJANI, B.; GILMORE, D.; LOUZIR, H.; VALENZUELA, JG. BEN.; AHMED, M. Salivary antigen

SP32 is the immunodominant target of the antibody response to *Phlebotomuspapatasi* bites in humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(11):e1911, 2012.

54. MCCONVILLE, MJ.; NADERER, T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol*. 65:543–61, 2011.

55. MENDONÇA, MG.; DE; BRITO, ME.; RODRIGUES, EH.; BANDEIRA, V.; JARDIM, ML.; ABATH, FG. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis*. Mar 15;189(6):1018-23, 2004.

56. NADERER, T.; MCCONVILLE, MJ. Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. *Essays Biochem*. 51:81-95, 2011.

57. NAIFF, RD.; TALHARI, S.; BARRETT, TV. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Oct-Dec;83(4):529-30, 1988.

58. NAIFF, RDJ; PINHEIRO, FG; NAIFF, MF; SOUSA, IS; CASTRO, LM; MENEZES, MP; FRANCO, AMR. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. Vol. 38 (2): 103-114. abr.-jun. 2009.

59. NOGUEIRA RW. Avaliação clínico-laboratorial de pacientes em tratamento de Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Amazonas. Trabalho de PIBIC, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 2008-2009.

60. NOVAIS, FO. Avaliação do Papel das Células T CD8+ na Infecção Experimental por *Leishmania braziliensis*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Curso de Pós-Graduação em Patologia, p.85, 2011.

61. NOVOA, R.; BACELLAR, O.; NASCIMENTO, M.; CARDOSO, TM.; RAMASAWMY, R.; OLIVEIRA, WN.; SCHRIEFER, A.; CARVALHO, EM. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. *Parasite Immunol*. Feb;33(2):132-6, 2011.

62. OLIVEIRA F., LAWYER PG, KAMHAWI S, VALENZUELA JG. Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-*Leishmania* Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease. *Plos ntd.* v. 2, 2008.
63. O'QUINN, DB.; PALMER, MT.; LEE, YK.; WEAVER, CT. Emergence of the Th17 pathway and its role in host defense. *Adv Immunol.* 99:115-63, 2008.
64. PAIVA CAVALCANTI M, DANTAS-TORRES F, CUNHA GONÇALVES DE ALBUQUERQUE S, SILVA DE MORAIS RC, DE BRITO ME, OTRANTO D, BRANDÃO-FILHO SP. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. *Mol Cell Probes.* Jun-Aug;27(3-4):122-8. 2013.
65. PETERS, NC.; EGEN, JG.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, MP.; GERMAIN, RN.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* Aug 15;321(5891):970-4, 2008.
66. PRAJEETH, C. K., HAEBERLEIN, S.; SEBALD, H.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines, but not of NK cell cytotoxicity. *Infect. Immun.* 79, 2699–2708, 2011.
67. REMER, K. A.; ROEGER, B.; HAMBRECHT, C.; MOLL, H. Natural killer cells support the induction of protective immunity during dendritic cell-mediated vaccination against *Leishmania major*. *Immunology.* 131, 570–582, 2010.
68. RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, RP.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* Jan;31(1):143-8, 1998.

69. RIBEIRO-GOMES, FL.; PETERS, NC.; DEBRABANT, A.; SACKS, DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*leishmania* response. *PLoS Pathog.* Feb;8 (2):e1002536, 2012.
70. RIBEIRO-GOMES, FL.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2:59, 2012.
71. ROBERTS, MT. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull.* Jul 17;75-76:115-30, 2006.
72. SALAY, G.; DORTA, ML.; SANTOS, NM.; MORTARA, RA.; BRODSKY, C. et al. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clin Vaccine Immunol.* 14:1173–1181, 2007.
73. STETSON, D. B.; MOHRS, M.; REINHARDT, R. L.; BARON, J. L.; WANG, Z. E.; GAPIN, L.; KRONENBERG, M.; LOCKSLEY, R. M. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J. Exp. Med.* 198, 1069–1076, 2003.
74. SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.* Dec;7(12):1707-13, 2005.
75. SOUSA-ATTA, ML.; SALAMÉ, GS.; D'OLIVEIRA, A. JR.; ALMEIDA, RP.; ATTA, AM.; CARVALHO, EM. Immunoglobulin E anti-leishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* Jan; 9(1):101-4, 2002.
76. STEINMAN, L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine.* 13(2):139–145, 2007.

77. SANTOS-GOMES, GM.; CAMPINO L, ABRANCHES P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Mar-Apr;95(2):193-8, 2000.
78. SILVEIRA, FT.; ISHIKAWA, EA.; DE, SOUZA.; AAA, LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite* 85: 43-50, 2002.
79. SILVEIRA, FT.; LAINSON, R.; CORBETT, CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 239-251, 2004.
80. TEIXEIRA, MM.; ARANTES, RM.; VIEIRA, LQ. Characterization of chronic cutaneous lesions from TNF-receptor-1-deficient mice infected by *Leishmania major*. *Clin Dev Immunol*. 865708, 2012.
81. TONUI, WK.; TITUS, RG. Cross-protection against *Leishmania donovani* but not *L. braziliensis* caused by vaccination with *L. Major* soluble promastigote exogenous antigens in BALB/c mice. *Am J Trop Med Hyg*. Mar;76(3):579-84, 2007.
82. TOLEDO, VP.; MAYRINK, W.; GOLLOB, KJ.; OLIVEIRA, MA.; COSTA, CA.; GENARO, O.; PINTO, JÁ.; AFONSO, LC. Immuno chemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *MemInstOswaldo Cruz*. Jan;96(1):89-98, 2001.
83. UNGER, A.; O'NEAL, S.; MACHADO, P. R.; GUIMARAES, L. H.; MORGAN, D. J.; SCHRIEFER, A.; BACELLAR, O.; GLESBY, M. J. AND.; CARVALHO, E. M. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 80, 574–579, 2009.

84. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/) acesso em: 11/06/2013.
85. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en>. Acesso:16/07/2013.
86. ZAPH, C.; UZONNA, J.; BEVERLEY, SM.; SCOTT, P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med.* Oct;10(10):1104-10, 2004.
87. ZWAHLEN, R.; WALZ, A.; ROT, A. In vitro and in vivo activity and pathophysiology of human interleu-kin-8 and related peptides. *Int Rev ExpPathol.* ;34:27-42, 1993.

## **CAPÍTULO II**

**Concentrações séricas de citocinas em pacientes infectados por diferentes espécies do gênero *Leishmania*.**

**Concentrações séricas de citocinas em pacientes infectados por diferentes espécies do gênero *Leishmania*.**

**Serum concentrations of cytokines in patients infected by different species of *Leishmania***

Tháís T. Espir<sup>1</sup>, Luanda de P. Figueira<sup>1</sup>, Maricleide de F. Naiff<sup>1</sup>, Allyson G. da Costa<sup>3</sup>,  
Marcelo Ramalho-Ortigão<sup>4</sup>, Adriana Malheiro<sup>3</sup>, Antonia Maria R. Franco<sup>1</sup>.

1. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.
2. Fundação Oswaldo Cruz- Instituto Leônidas e Maria Deane, Manaus, AM.
3. Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus, AM.
4. Department of Entomology, Kansas State, Manhattan, KS, 66506 USA.

Fonte de financiamento: FAPEAM, CAPES.

**Endereço para correspondência:** Dra. Antonia Maria Ramos Franco. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Av. André Araújo, 2.936 - Petrópolis - CEP 69060-001 - Manaus - AM, Brasil.

E-mail: afranco@inpa.gov.br

## RESUMO

Foram analisadas as concentrações séricas de citocinas em amostras de sangue periférico de 33 pacientes infectados por *Leishmania* spp. atendidos no Hospital Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão, localizado no município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas, Brasil. Todos os pacientes apresentavam lesões cutâneas, cujas cepas isoladas foram caracterizadas por eletroforese de isoenzimas e identificadas como *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A maior parte dos pacientes era do sexo masculino (64%) e a faixa etária variou de 18 a 58 anos. A análise comparativa das citocinas pró-inflamatória, regulatória e de perfil T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 e T<sub>H</sub>17 entre os indivíduos infectados e não infectados (grupo controle) e entre as diferentes espécies circulantes na região, apresentou diferença estatística significativa. Pacientes infectados apresentaram maiores concentrações séricas das citocinas quando comparados aos controles. Na comparação entre primo-infectados e pacientes com segunda infecção, notou-se maior concentração das citocinas de perfil T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 e T<sub>H</sub>17 na infecção primária. Infecção causada por *L. (V.) guyanensis* foi responsável por 73% dos casos e apresentou maior concentração de IL-2; IFN- $\gamma$ ; IL-4 e IL-17 quando comparado com infecção causada por *L. (L.) amazonensis*. Pacientes com infecção por *L. (V.) naiffi* apresentaram maior concentração das citocinas analisadas quando comparado aos não infectados, porém, não houve diferença estatística significativa com as outras espécies.

Descritores: Leishmaniose cutânea, *Leishmania*, citocinas, Amazonas.

## ABSTRACT

We analyzed the serum concentrations of cytokines in peripheral blood samples of 33 patients infected with *Leishmania* spp. treated at the Thomé de Medeiros Raposo Hospital and Manoel Rumão Basic Healthcare Unit, in Rio Preto da Eva municipality, Amazonas state, Brazil were analyzed. All patients had skin lesions whose isolates were characterized by isoenzyme electrophoresis and identified as *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffi* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Most patients were male (64%) and the age range was 18 to 58 years. A comparative analysis of pro-inflammatory and regulatory profile T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and T<sub>H</sub>17 among individuals infected and uninfected (control group) and between different species circulating in the region, showed significant difference. Infected patients showed significantly higher serum concentrations of cytokines when compared to controls. In the comparison between primo-infected patients and second infection, we noted a higher concentration of the cytokine profile of T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and T<sub>H</sub>17 primary infection. Infection caused by *L. (V.) guyanensis* accounted for 73% of the cases and showed higher concentrations of IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-17 when compared to infection by *L. (L.) amazonensis*. Patients with infection by *L. (V.) naiffi* showed higher concentration of the cytokines analyzed when compared to uninfected, however, there was no statistically significant difference with the other species.

Key words: Cutaneous leishmaniasis, cytokines, *Leishmania*, Amazon.

## INTRODUÇÃO

A infecção por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* está associada a um amplo espectro de características clínicas que vão desde lesões cutâneas auto-cicatrizantes na leishmaniose tegumentar americana (LTA) até as formas fatais que podem vir a ocorrer na leishmaniose visceral. No Brasil, a LTA destaca-se por sua ampla distribuição, ocorrendo em todos os Estados da Federação. Estima-se que entre 1990 e 2010 ocorreram mais de 618.207 casos, com as maiores taxas registradas na Região Norte do país (40%), representando um grave problema de saúde pública (BRASIL, 2006; GUIMARÃES 2011). A LTA é primariamente uma zoonose (BARRETT; SENRA 1989), com ciclo de transmissão ocorrendo entre os flebotomíneos vetores e os animais silvestres. Na maioria das vezes, o homem se infecta ao alterar o ambiente interpondo-se ao ciclo silvestre ao penetrar nesse ecossistema (LAINSON, 1985; GUERRA et al., 2006; BRASIL, 2007).

O quadro clínico depende principalmente da espécie infectante, porém fatores relacionados ao hospedeiro também podem determinar o curso da infecção (MAUEL, 2002). Diferentes espécies de *Leishmania* são responsáveis pelos casos de LTA, sendo que, na Amazônia, sete espécies estão envolvidas, seis do subgênero *Viannia*: *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*V.*) *lainsoni*, *L.* (*V.*) *naiffi*, *L.* (*V.*) *shawi*, *L.* (*V.*) *lindenbergi* e uma do subgênero *Leishmania*: *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (SILVEIRA et al., 2002; 2004). Já no estado do Amazonas, foram descritas até o momento a *L.* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*V.*) *naiffi*, *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *lainsoni* e *L.* (*L.*) *amazonensis* (TALHARI et al., 2011).

No estado do Amazonas, *L. (V.) guyanensis* é a espécie predominante (NAIFFI et al., 1999; TALHARI, 2009) e o período de incubação da doença no homem é, em média, de 60 dias, variando de 2 semanas a 24 meses (BRASIL, 2007).

A leishmaniose cutânea pode evoluir para a cura espontânea ou progredir para a formação de pápulas, nódulos, placas e, principalmente, úlceras. Podem ocorrer, também, invasão de linfonodos regionais e progressão para lesões mucosas. O que determinará a evolução da infecção e as diferentes formas de apresentação clínica da LTA será, basicamente, o tipo de resposta imunitária que o indivíduo irá desenvolver – seja essa  $T_H1$  ou  $T_H2$  (MATTA et al., 2009). Esta resposta inflamatória, por outro lado, dependerá de aspectos ainda não totalmente conhecidos, tais como fatores genéticos do hospedeiro e a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção (SILVEIRA et al., 2004; 2008). Dentre os fatores genéticos incluem-se a existência de genes promotores do Fator de Necrose Tumoral (TNF), resposta efetiva de células Natural Killers (NK) frente à interleucina 12 (IL-12) a produção adequada de interferon gama ( $INF-\gamma$ ), dentre outras, além da espécie de *Leishmania* responsável pela infecção (SILVEIRA et al., 2004; 2008).

O tratamento da LTA é baseado em quimioterapia e depende da forma clínica e comorbidades. A droga de primeira escolha para o tratamento no Brasil é o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantine®) [OLIVEIRA et al., 2012]. Os índices de cura com os antimoniais, na LTA, são difíceis de ser avaliados, face à falta de estudos controlados e das diferentes posologias empregadas (TALHARI, 2009). É provável que as espécies de *Leishmania* tenham influência na resposta terapêutica aos antimoniais (ROMERO et al., 2001; AREVALO 2007). Já no que diz respeito ao diagnóstico, no caso deste ser o parasitológico para LTA faz-se o exame direto ou cultura, utilizando material coletado para biópsia ou escarificado da lesão. A confirmação laboratorial deve ser preferencialmente por meio do encontro do parasito em tecido cutâneo (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Existem

dificuldades quanto a esse diagnóstico, que é realizado por associações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais. Considerando os benefícios da citometria de fluxo e sua abordagem utilizada na pesquisa, este estudo apresenta, por meio dessa técnica, a análise das concentrações séricas das citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) no curso clínico da infecção causada por diferentes espécies de leishmanias causadoras da LTA antes do tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde.

O conhecimento dos mecanismos da infecção, do funcionamento do sistema imune do hospedeiro, e a terapêutica utilizada nas regiões onde ocorrem diferentes espécies circulantes do parasito são de suma importância para o planejamento de estratégias de controle da doença. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os aspectos clínicos e imunológicos de 33 pacientes com LTA, atendidos em uma Unidade Básica de Saúde e no Hospital do município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

**Área de estudo:** O município de Rio Preto da Eva, Amazonas, situa-se próximo ao Km 80 da Rodovia AM-010 (3°07'06" S, 59°W), distando 57,5 Km da capital do Estado, fazendo parte da Região Metropolitana de Manaus. A cobertura vegetal é de floresta tropical úmida de terra-firme, apresentando grande diversidade de espécies.

**Casos clínicos:** Pacientes com suspeita de LTA foram examinados para o diagnóstico da infecção, tendo sido atendidos no Hospital Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão, em Rio Preto da Eva, Amazonas. O estudo foi desenvolvido de acordo com os requisitos do Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96, sendo aprovado pelo comitê de ética em pesquisas envolvendo seres humanos do INPA sob o número 193/2008 e 006/2010. Foram incluídos pacientes diagnosticados com LTA,

ocasionada por diferentes espécies do parasito e um grupo de indivíduos sem infecção (controle negativo), pareados por sexo e idade. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aceitando participar da pesquisa (Anexo I e III) e responderam questionário padrão (Anexo II)

**Exames Parasitológicos e Isolamento Parasitário:** Todos os pacientes foram submetidos a exame direto por escarificação da borda das lesões cutâneas para pesquisa de amastigotas em lâminas, utilizando-se o kit Panótico (Marca: LB Laborclin) e microscopia óptica. O material escarificado da borda das lesões também foi semeado em meio de cultivo bifásico ágar sangue NNN (Neal, Novy, 1904; Nicolle, 1908) e posteriormente expandido em meio líquido Schneider completo (pH 7,2 contendo 10% de Soro Fetal Bovino inativado/SFBI), para preparação de massa parasitária a ser utilizada na caracterização bioquímica e criopreservação.

**Caracterização Bioquímica:** As cepas isoladas foram caracterizadas pela técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de agarose, conforme protocolo descrito por Cupolillo (1992) utilizando oito sistemas enzimáticos: Malato Desidrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), Isocitrato Desidrogenase (IDH, E.C.1.1.1.42) com substrato NAD e NADP, Enzima Málica (ME, E.C.1.1.1.40), Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.44), Aconitato Hidratase (ACON, E.C.4.2.1.3) e Hexoquinase (HK, E.C.2.7.1.1). A identificação das espécies foi obtida através da comparação dos perfis isoenzimáticos das amostras com cepas padrões de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8).

***Amostras de sangue periférico:*** Para obtenção de soro e plasma foram colhidos 4 mL de sangue periférico dos pacientes e dos indivíduos sem infecção (controles negativos). As amostras foram coletadas em tubos vacutainer (BD Vacutainer™, Juiz de Fora, MG, Brasil) sem solução de EDTA como anticoagulante.

***Análise de Citocinas Séricas:*** A dosagem de citocinas das amostras de soro dos pacientes e controles foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (Cytometric Bead Array) com o Kit BDTM Human T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>17 Cytokine (Cat. N° 560484, Lot.: 29132, marca BD® Biosciences, San Diego, CA, USA), seguindo as orientações descritas pelo fabricante. As citocinas quantificadas foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL17.

O Kit BDTM CBA utiliza uma série de partículas (microesferas ou beads) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada bead de captura está conjugada com um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra é realizada através de anticorpos conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a bead. Os complexos formados de bead de captura + citocina da amostra + anticorpo de detecção são quantificados através da Citometria de Fluxo. A intensidade da Fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM. Para o cálculo das concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina foi utilizado o software FCAP-Array™ (v3.0.1).

***Leitura e análises estatísticas:*** A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD) e as análises das concentrações séricas foram realizadas com o software FCAP-Array (v3.0). Os resultados foram analisados com o software estatístico GraphPad Prism® (v6.0). Utilizando teste não-paramétrico (Kruskall-Wallis e Mann-Whitney). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## RESULTADOS

Durante o período de estudo, foram atendidos 33 pacientes, sendo 24 primo-infecção e nove pacientes que apresentaram segunda infecção por formas clínicas de leishmaniose cutânea causada por diferentes espécies envolvidas na transmissão (Fig. 1). Foram coletadas 19 amostras de sangue periférico de indivíduos não infectados enquadrados como grupo controle.

Nos pacientes que apresentaram primo-infecção para LTA a espécie *L. (V.) guyanensis* foi responsável por 19 (73%) casos da infecção, seguida por *L. (L.) amazonensis* com 12% (quatro indivíduos) e *L. (V.) naiffi* com três casos (9%). Em sete pacientes (21%) não foi possível realizar a caracterização da espécie. Os pacientes com suspeita de infecção por leishmanias foram atendidos no Hospital Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão, em Rio Preto da Eva. Na Tabela 01, estão descritas informações de dados demográficos e as características clínico-epidemiológicas dos pacientes, obtidas a partir dos questionários aplicados, onde 21 (64%) eram do sexo masculino e 12 (36%) do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 18 a 58 anos. Os pacientes apresentaram de uma a oito lesões cutâneas, sendo que a grande maioria (23/69%) apresentava única lesão. O tempo de evolução variou de 07 a 180 dias (Tab. 01). Em relação à ocupação, 100% dos pacientes era agricultor.



Figura 1. Lesões cutâneas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva. Lesões de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis* (1), *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (2) e *Leishmania (Viannia) naiffi* (3,4).

Tabela 01. Dados clinico-epidemiológicos de pacientes com leishmaniose tegumentar na Unidade Mista de Saúde Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão, Rio Preto da Eva/AM.

Código Internacional <sup>a</sup>	Gênero sexual	Espécie	Idade (anos)	Tempo de Infecção (dias)	Nº de lesões	Nº de infecções	Tamanho da Lesão <sup>1</sup> (mm)
MHOM/BR/09/IM5553	M	<i>L. naiffi</i>	34	120	01	p	NR
MHOM/BR/09/IM5562	M	<i>L. naiffi</i>	26	160	02	P	02x02
MHOM/BR/09/IM5584	M	<i>L. amazonensis</i>	58	45	01	P	08x08
MHOM/BR/10/IM5637	F	<i>L. guyanensis</i>	31	60	01	P	17x18
MHOM/BR/10/IM5641	F	<i>L. guyanensis</i>	41	150	03	S	21x15
MHOM/BR/10/IM5653	M	<i>L. guyanensis</i>	18	90	01	P	30x20
MHOM/BR/10/IM5657	M	<i>L. guyanensis</i>	56	37	01	P	19x17
MHOM/BR/10/IM5665	M	<i>L. naiffi</i>	23	90	03	P	08x06
MHOM/BR/10/IM5684	M	<i>Leishmania sp.</i>	41	NR	01	S	NR
MHOM/BR/10/IM5690	F	<i>L. guyanensis</i>	58	60	01	P	17x18
MHOM/BR/10/IM5692	F	<i>L. guyanensis</i>	30	15	02	P	60x60
MHOM/BR/10/IM5694	M	<i>L. guyanensis</i>	29	14	01	P	20x23
MHOM/BR/11/IM5697	M	<i>L. guyanensis</i>	19	14	01	P	13x16
MHOM/BR/11/IM5749	M	<i>L. guyanensis</i>	38	30	01	P	17x14
MHOM/BR/11/IM5772	M	<i>L. guyanensis</i>	26	120	01	P	10x08
MHOM/BR/11/IM5773	M	<i>L. guyanensis</i>	30	10	01	P	32x21
MHOM/BR/11/IM5775	M	<i>L. guyanensis</i>	24	21	04	P	08x05
MHOM/BR/11/IM5828	M	<i>L. guyanensis</i>	43	150	01	P	11x8
MHOM/BR/11/IM5833	F	<i>L. guyanensis</i>	21	30	01	P	70x70
MHOM/BR/11/IM5869	M	<i>L. guyanensis</i>	24	60	08	P	60x60
MHOM/BR/11/IM5875	M	<i>L. guyanensis</i>	49	30	01	P	11x7
MHOM/BR/11/IM5894	M	<i>L. guyanensis</i>	27	30	01	S	20x12
MHOM/BR/11/IM5950	F	<i>L. amazonensis</i>	30	30	01	P	25x26
MHOM/BR/11/IM5955	F	<i>L. amazonensis</i>	29	15	01	P	60x90
MHOM/BR/11/IM5962	M	<i>Leishmania sp.</i>	30	60	02	S	06x05
MHOM/BR/11/IM5969	F	<i>Leishmania sp.</i>	30	15	01	S	10x07
MHOM/BR/11/IM5976	F	<i>L. guyanensis</i>	18	21	01	P	17x13
MHOM/BR/11/IM5985	F	<i>L. guyanensis</i>	25	15	01	P	12x12
MHOM/BR/12/IM6006	M	<i>Leishmania sp.</i>	33	180	01	S	NR
MHOM/BR/12/IM6016	F	<i>Leishmania sp.</i>	30	120	04	S	11x11
MHOM/BR/12/IM6025	M	<i>Leishmania sp.</i>	31	07	01	S	01x01
MHOM/BR/12/IM6034	M	<i>L. amazonensis</i>	42	21	01	P	29x15
MHOM/BR/12/IM6038	F	<i>Leishmania sp.</i>	48	30	01	S	17x17

\*Legenda: Isolados: M-mamífero; HOM- *Homo sapiens*; BR-país de origem (Brasil)/ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA; Sexo: M- masculino; F- feminino. NR: não-realizado.1= lesão de maior tamanho; P=infecção primária; S=infecção secundária.

### **Concentração das Citocinas Séricas nos pacientes com Leishmaniose cutânea:**

As concentrações séricas das citocinas estão descritas em pg/mL e foram utilizadas nas análises estatísticas.

Citocinas pró-inflamatórias e de perfil T<sub>H</sub>1 (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) dosadas pela metodologia do CBA nos pacientes primo-infectados pelas três espécies encontradas, apresentaram valores significativos quando comparado com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados (controles negativos) obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. Os valores encontrados foram  $p < 0,0001$  para IL-2 e  $p = 0,0002$  para TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Fig. 02). Na análise comparativa das citocinas pró-inflamatórias entre as espécies, foi encontrado diferença significativa entre *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* para IL-2 que apresentou  $p = 0,0002$  e IFN- $\gamma$  com  $p = 0,0412$ . Notou-se que pacientes com *L. (V.) guyanensis* apresentaram maiores concentrações dessas citocinas quando comparado à infecção por *L. (L.) amazonensis*. Apesar de pacientes infectados por *L. (V.) naiffi* não apresentarem valores distintos estatisticamente com as outras espécies analisadas, pôde-se observar que dois indivíduos (MHOM/BR/09/IM5553 e MHOM/BR/10/IM5665) com infecção por *L. (V.) naiffi* apresentaram elevada concentração de TNF- $\alpha$ . Maior concentração de IFN- $\gamma$  na infecção por *L. (V.) guyanensis* também foi observada quando comparado as outras espécies.

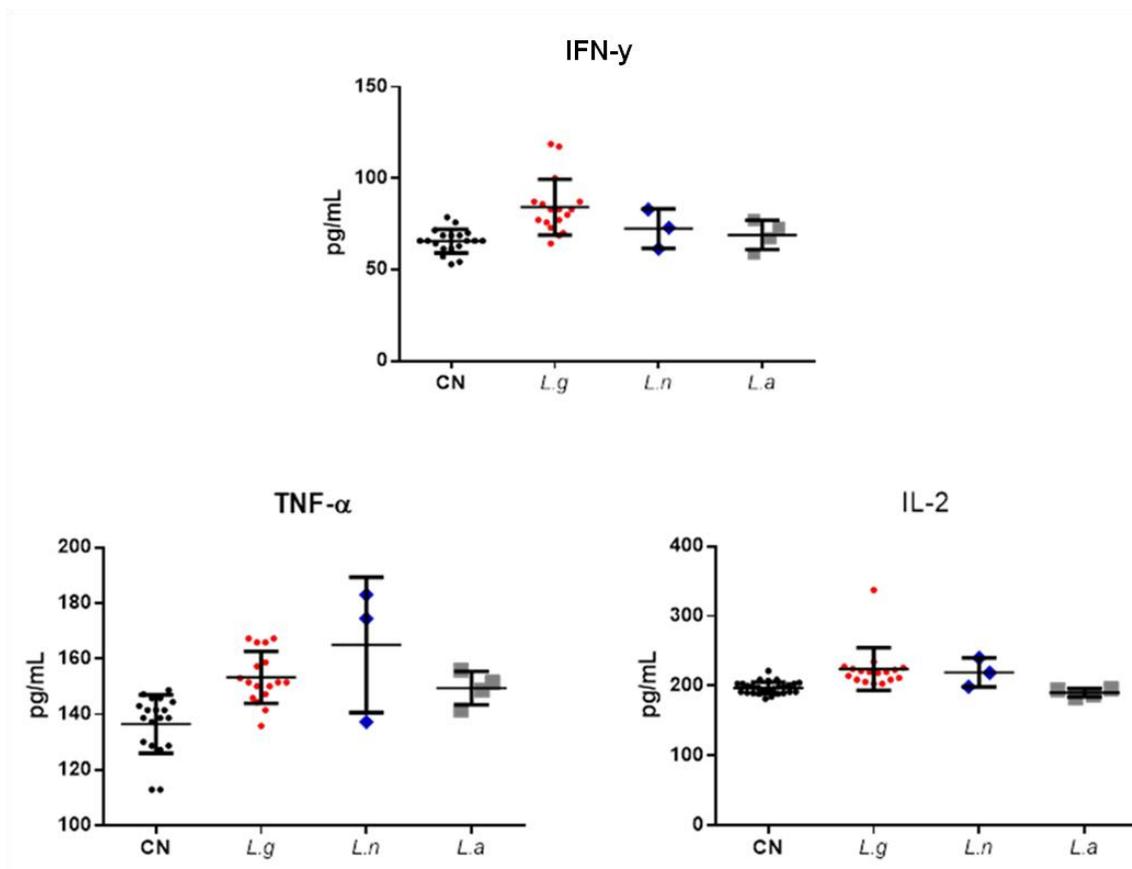


Figura 02. Concentrações séricas de citocinas (IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) em amostras do soro de pacientes infectados por *Leishmania* e indivíduos não infectados (grupo controle). Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão (linhas horizontais e verticais) de citocinas séricas (pg/mL). Legenda: CN- controle negativo; L.g- *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*; L.n- *L. (Viannia) naiffi*; L.a- *L. (Leishmania) amazonensis*.

Citocina regulatória (IL-10) e de perfil T<sub>H</sub>2 e T<sub>H</sub>17 (IL-4, IL-6 e IL-17) nos primoinfectados apresentaram diferença significativa na análise comparativa entre os dois grupos (não infectados x infectados/todas as espécies). A IL-10 apresentou aumento significativo no grupo de indivíduos infectados quando comparado com os controles  $p=0,0002$ . O mesmo foi observado na concentração da IL-4 ( $p=0,0016$ ); IL-6 ( $p<0,0001$ ) e IL-17 ( $p=0,0002$ ).

Diferença significativa foi observada ainda entre os subgrupos analisados, na comparação entre as diferentes espécies de *Leishmania* foi encontrada diferença na

concentração de IL-4 ( $p=0,0132$ ); IL-10 ( $p=0,0085$ ) e IL-17 ( $p=0,0042$ ) nos pacientes com infecção causada por *L. (V.) guyanensis* quando comparado com infecção causada por *L. (L.) amazonensis* (Fig. 03). IL-6 não apresentou diferença significativa na análise entre as espécies estudadas.

Observou-se que mesmo sem diferença estatística significativa, pacientes infectados por *L. (V.) naiffi* apresentaram maior concentração dessas citocinas quando comparado com *L. (L.) amazonensis*. Notou-se que o perfil das citocinas em infecção por *L. (V.) naiffi* parece ser semelhante à infecção por *L. (V.) guyanensis*.

Nos pacientes com segunda infecção por *Leishmania*, foi encontrada diferença estatística significativa para IL-2  $p<0,0001$  e IFN- $\gamma$   $p=0,0006$  que apresentaram menores concentrações quando comparados aos controles. A citocina TNF- $\alpha$  não apresentou diferença significativa. Bem como não foi encontrada diferença nas citocinas (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) entre indivíduos infectados por *L. (V.) guyanensis* e indivíduos sem espécie caracterizada (Fig. 04). No entanto, mesmo sem apresentar diferença estatística significativa, a concentração sérica do TNF- $\alpha$  na segunda infecção por *Leishmania* apresentou menor nível quando comparado aos controles. Tal citocina, nesse grupo estudado (segunda infecção) foi a única a apresentar queda antes do início do tratamento.

A citocina regulatória IL-10 nos pacientes com segunda infecção para LTA apresentou aumento significativo quando comparado aos controles ( $p < 0,0001$ ). Diferença significativa também foi observada para (IL-4 e IL-17) com  $p = 0,0187$  e  $p = 0,0004$  respectivamente. Na análise estatística a IL-6 não apresentou diferença significativa entre infectados e não infectados, entretanto, a média da concentração dessa citocina foi maior do que o observado no grupo controle.

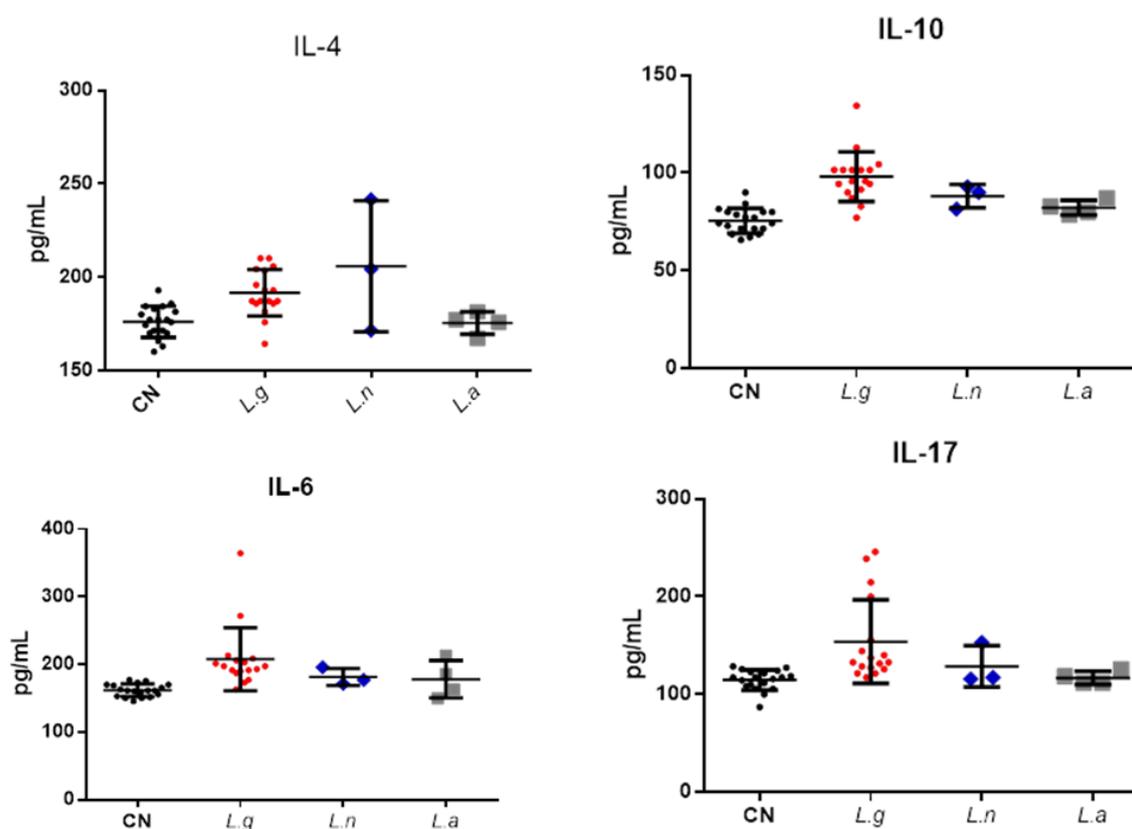


Figura 03. Concentrações séricas de citocinas (IL-10, IL-4, IL-6 e IL-17) em amostras do soro de pacientes infectados por *Leishmania* e população sem infecção (controles). Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$ desvio padrão (linhas horizontais e verticais) padrão de citocinas séricas (pg/mL). Legenda: CN- controle negativo; L.g- *L. (Viannia) guyanensis*; L.n- *L. (Viannia) naiffi*; L.a- *L. (Leishmania) amazonensis*.

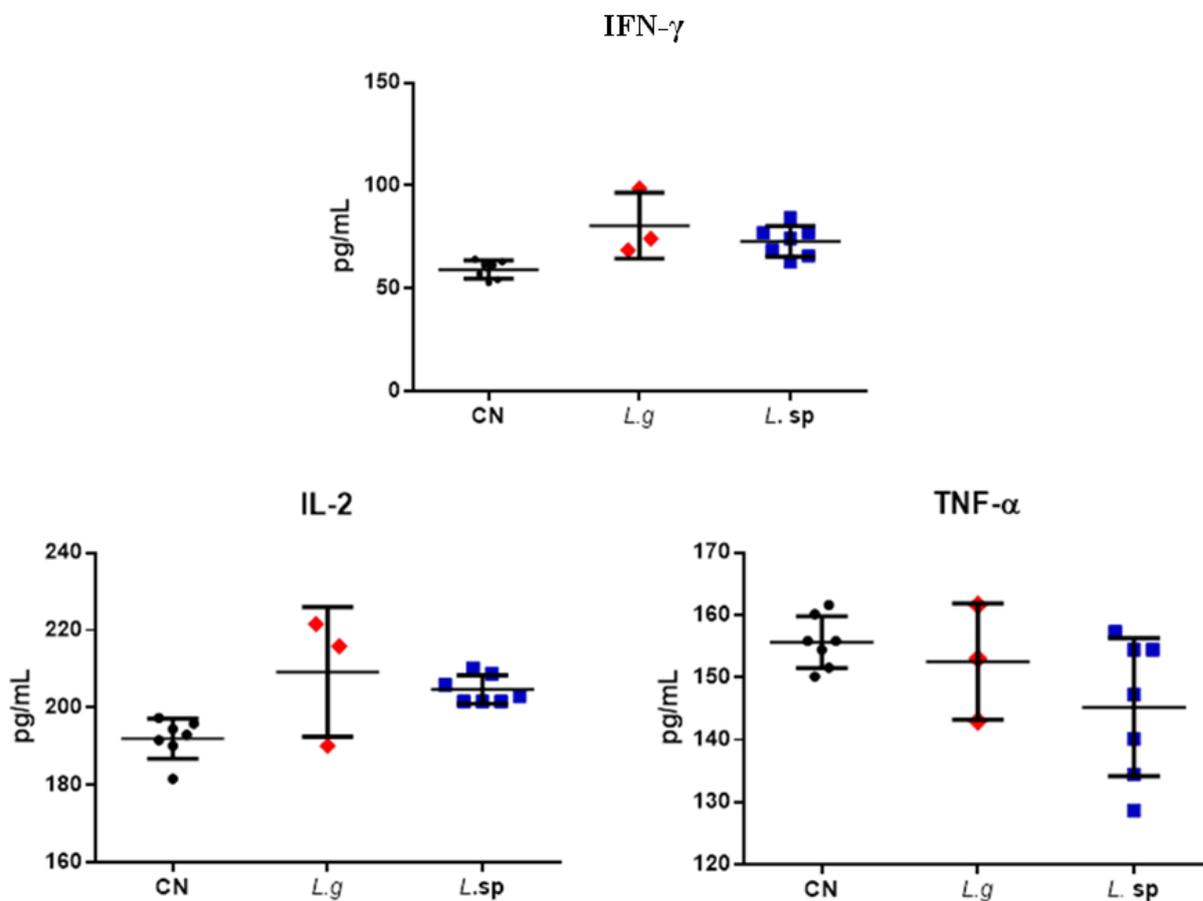


Figura 04. Concentrações séricas de citocinas (IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) em amostras do soro de pacientes com segunda infecção por *Leishmania* e indivíduos sem infecção (controles). Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$ desvio padrão (linhas horizontais e verticais) de citocinas séricas (pg/mL). Legenda: CN- controle negativo; L.g- *L. (Viannia) guyanensis*; L.sp- *Leishmania sp.*

Nenhuma diferença estatisticamente significativa nas concentrações das citocinas entre *L. (V.) guyanensis* e *Leishmania sp* foi observada (Fig. 05).

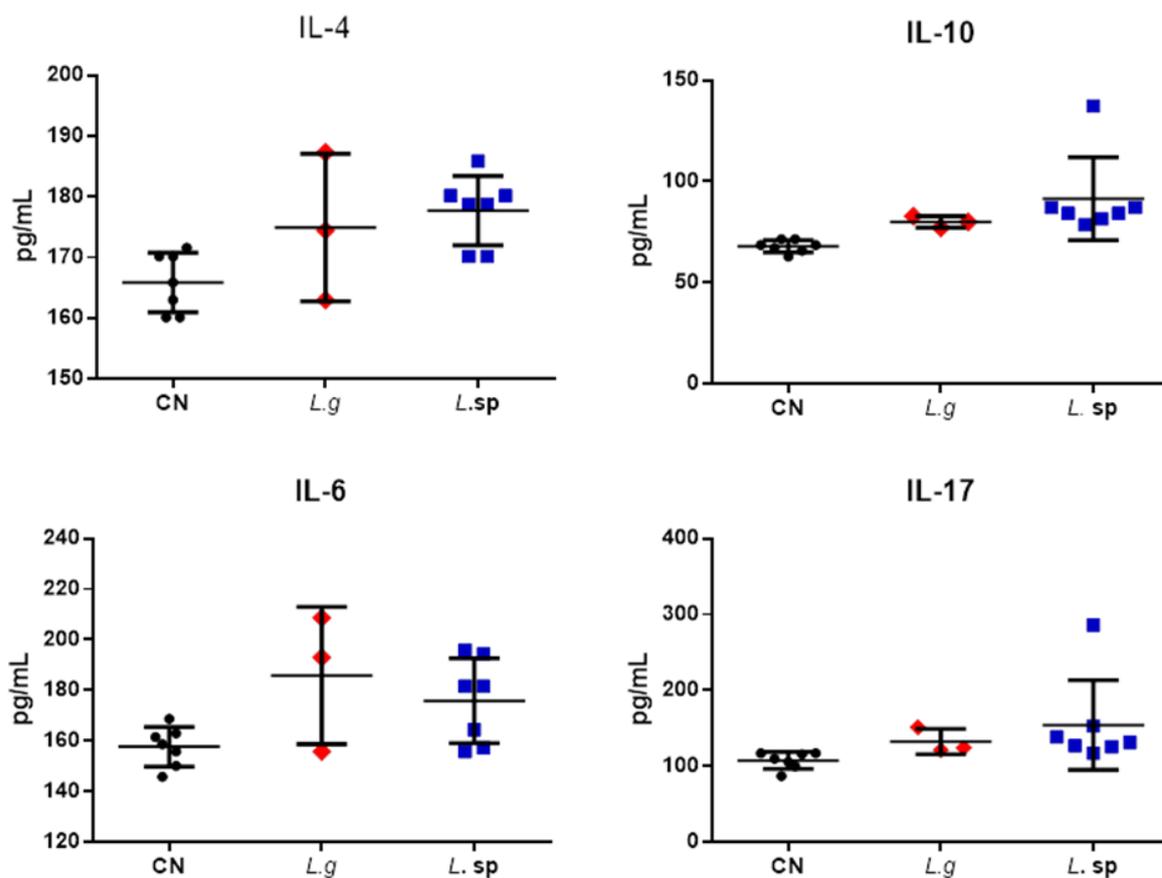


Figura 05. Concentrações séricas de citocinas (IL-10, IL-4, IL-6 e IL-17) em amostras do soro de pacientes com segunda infecção por *Leishmania* e indivíduos sem infecção (controles). Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$ desvio padrão (linhas horizontais e verticais) padrão de citocinas séricas (pg/mL). Legenda: CN- controle negativo; L.g- *L. (Viannia) guyanensis*; L.sp- *Leishmania* sp.

As figuras 06 e 07 mostram as concentrações das citocinas nos dois grupos estudados (primo-infectados e pacientes com segunda infecção para LTA) e controles. Notou-se que as concentrações das citocinas foram maiores no grupo com primo-infecção quando comparado aos com segunda infecção e controles. Na análise das citocinas de perfil  $T_H1$  foi encontrado diferença significativa entre pacientes infectados (primo e segunda infecção) e não infectados

para IL-2 e IFN- $\gamma$  ( $p < 0,0001$  em ambas citocinas) e TNF- $\alpha$  ( $p = 0,0009$ ). Ao compararmos as concentrações dessas citocinas entre pacientes primo-infectados com segunda infecção para LTA não foi observado diferença estatística significativa entre os dois grupos, apesar dos primo-infectados apresentarem maiores concentrações séricas de (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ). Notou-se com esse resultado que TNF- $\alpha$  na infecção secundária por *Leishmania* é expresso em menor concentração do que na infecção primária, porém sem diferença estatística significativa ( $p = 0,2100$ ) [Fig. 06].

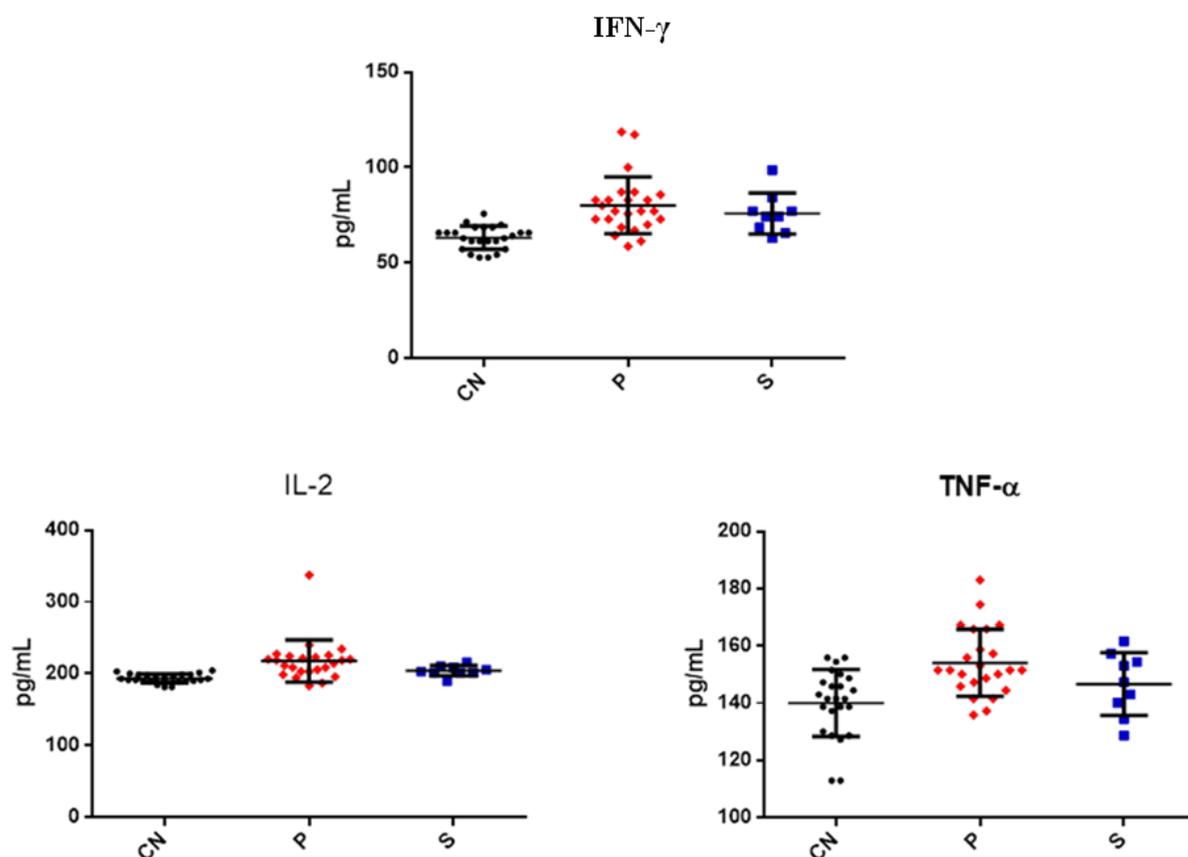


Figura 06. Concentrações séricas de citocinas (IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) em amostras do soro de pacientes primo-infectados e com segunda infecção por *Leishmania* e indivíduos sem infecção (controles). Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão (linhas horizontais e verticais) de citocinas séricas (pg/mL). Legenda: CN- controle negativo; P= infecção primária; S= infecção secundária.

Na análise das citocinas regulatórias e de perfil  $T_H2$  e  $T_H17$  entre os primo-infectados e com segunda infecção foi encontrado diferença significativa nas concentrações séricas de IL-4 ( $p=0,0086$ ) e IL-10 ( $p=0,0297$ ). Na comparação entre pacientes (primo e segunda infecção) e controles negativos foi observado diferença significativa para todas as citocinas analisadas, sendo IL-4 ( $p=0,0012$ ); IL-10 e IL-6 ( $p<0,0001$ ) e IL-17 ( $p=0,0006$ ) [Fig. 7].

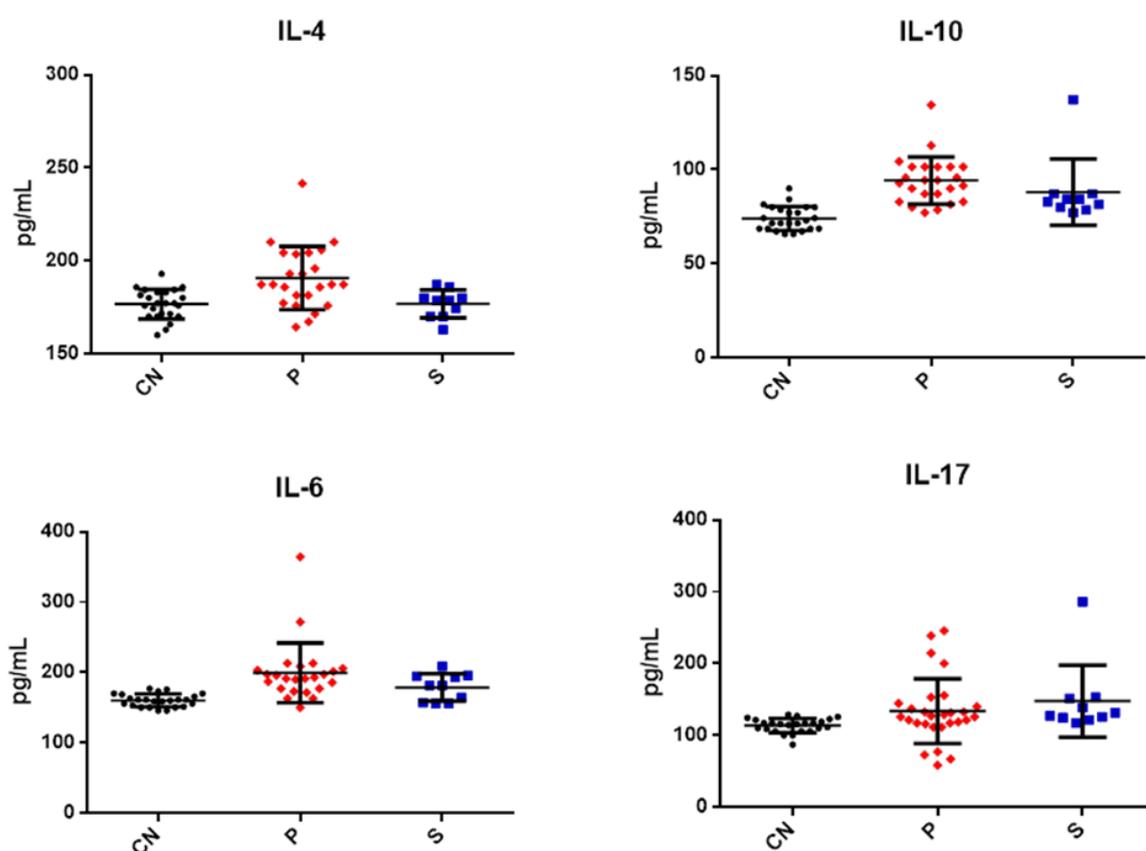


Figura 07. Concentrações séricas de citocinas (IL-10, IL-4, IL-6 e IL-17) em amostras do soro de pacientes primo-infectados e com segunda infecção por *Leishmania* e indivíduos sem infecção (controles). Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$ desvio padrão (linhas horizontais e verticais) de citocinas séricas (pg/mL). Legenda: CN- controle negativo; P= infecção primária; S= infecção secundária.

## DISCUSSÃO

A LTA é caracterizada por um espectro de manifestações cutâneas. O sinal clínico clássico inicial da doença é o aparecimento de um nódulo eritematoso, que pode ser único ou múltiplos, geralmente localizado em região exposta do tegumento. Ao realizar o diagnóstico da LTA é importante investigar a história do paciente, os achados clínicos, a informação epidemiológica e realizar testes diagnósticos adicionais. Nesse trabalho expomos as concentrações séricas de citocinas na infecção por diferentes espécies de *Leishmania* em pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea e que não haviam iniciado o tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde.

As citocinas possuem papel central na resposta imune, apresentando efeitos locais e sistêmicos (ALEXANDER; HILTON, 2004). O equilíbrio na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias determina o perfil de resposta imune, além de influenciar na gravidade da doença (KAIKO et al., 2008 ; RAUTAJOKI et al., 2008).

Especialmente em camundongos a resistência à infecção está associada a uma resposta  $T_H1$  com a produção de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  enquanto a suscetibilidade deve-se a uma resposta regulatória com a produção de IL-10 e também de outras citosinas como IL-4 e TGF- $\beta$  (BARRAL et al., 1993; BOGDAN, 1998; KANE et al., 2001; MURRAY et al., 2002; TRINCHIERI et al., 2003; TRINCHIERI et al., 2007).

As citocinas pró-inflamatórias e precursoras de perfil  $T_H1$  (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) apresentaram maiores concentrações em indivíduos primo-infectados quando comparados com controles negativos. Tais citocinas estimulam atividade macrofágica que desempenha papel crucial no mecanismo de eliminação do parasita (BACELLAR et al., 2002; DEGROSSOLI et al., 2011). Na análise comparativa entre as espécies, constatou-se que *L. (V.) guyanensis* apresenta maior concentração de IL-2 e IFN- $\gamma$  quando comparado com infecção por *L. (L.) amazonensis*. Apesar de pacientes primo-infectados por LTA

apresentarem maiores concentrações dessas citocinas, não foi encontrada diferença significativa com as amostras de pacientes com segunda infecção. IFN- $\gamma$  é produzido por células T, células dendríticas, macrófagos e células NK e tem a função de induzir a síntese de óxido nítrico no macrófago, ativando funções microbidas ao parasita (TRINCHIERI et al., 1993; REINER, LOCKSLEY, 1995). Esta citocina limita o crescimento de *Leishmania* sp. em macrófagos murinos e humanos, limitando assim a progressão da doença (MURRAY et al, 1992). Nestes modelos, a modulação local ou sistêmica dos níveis de IFN- $\gamma$  é um determinante crítico na resolução da infecção. Também foi constatado por LIEW, 2003 que o TNF- $\alpha$  produzido, sobretudo por macrófagos, age juntamente com IFN- $\gamma$ , induzindo a produção de óxido nítrico e conseqüentemente a morte de amastigotas no interior de macrófagos. Estudo realizado por Pinheiro e Rossi-Bergmann, 2007 indicou que o IFN-  $\gamma$  é necessário para o controle de infecção por *L. major* contendo a expansão de células T<sub>H2</sub> em infecções experimentais causada por essa espécie. Este mesmo estudo sugere que a ação dessa citocina se mantém de maneira distinta nas infecções por *L. major* e *L. amazonensis* demonstrando que em infecções por *L. amazonensis* a ação do IFN- $\gamma$  não é efetiva nas primeiras semanas de infecção. A IL-10 exerce efeito importante sobre a produção do IFN- $\gamma$  tanto ao nível de controle da indução como ao nível da função efetora, tal fator, pode determinar o curso da infecção por *Leishmania* (KIMA; SOON, 2013).

Latifynia et al. (2012) avaliaram os níveis de TNF- $\alpha$  nas amostras do soro de pacientes com infecção ativa por *Lesihmania* e pacientes que receberam tratamento e apresentaram recidiva, constataram que a concentração dessa citocina não foi elevada e não houve diferença em sua concentração quando comparado aos controles, apesar desse estudo não citar se esses pacientes tinham infecção primária ou secundária, a baixa concentração do TNF- $\alpha$  parece desempenhar um papel essencial nas infecções graves por *Leishmania* (LATIFYNIA et al., 2012). No presente estudo, observou-se queda na concentração do TNF-

$\alpha$  nas amostras de pacientes com segunda infecção mas sem diferença significativa quando comparado aos controles, reforçando sua importância durante processo infeccioso.

Nesse trabalho, foi verificado aumento significativo das citocinas IL-10, IL-4, IL-6 e IL-17 no grupo infectado quando comparado aos controles. Notou-se que pacientes infectados por *L. (L.) amazonensis* expressam menor concentração sérica de IL-4 e IL-17 quando comparado a infecção causada por *L. (V.) guyanensis*.

A IL-17 desempenha papel fundamental no processo inflamatório, em doenças autoimunes e câncer (KOLLS; LINDÉN, 2004; KOSTKA et al., 2009; LEE et al., 2010). A IL-17 possui múltiplos efeitos, atuando tanto na indução de citocinas pró-inflamatórias quanto no recrutamento e ativação de leucócitos. Embora seu papel na leishmaniose cutânea não ser totalmente compreendido, essa citocina parece desempenhar importante papel na patogênese da doença (BACELLAR et al., 2009; BUENO et al., 2012). Bacellar et al. (2009) observaram que IL-17 é produzida durante infecção por *L. (V.) braziliensis* e linfócitos obtidos de pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea, produziram concentrações mais elevadas de IL-17 que linfócitos obtidos a partir de indivíduos não infectados. A presença das células T<sub>H</sub>17 na lesão foi associada aos neutrófilos e a destruição tecidual (BACELLAR et al., 2009; BOAVENTURA et al., 2010). Na infecção por *L. guyanensis* a IL-17 apresentou maior concentração quando comparado às outras espécies analisadas. Todavia, não foi observada diferença significativa entre os primo-infectados e com segunda infecção por *L. guyanensis* desse estudo.

A IL-6 é uma citocina produzida por diversos tipos de células e está envolvida na resposta da fase aguda, na maturação das células B e diferenciação de macrófagos. A IL-6 promove a diferenciação de T<sub>H</sub>2 e inibe simultaneamente T<sub>H</sub>1 através de mecanismos moleculares independentes. Nesse trabalho os pacientes primo-infectados apresentaram altas concentrações séricas de IL-6 quando comparados aos controles ( $p < 0,0001$ ), o mesmo não foi

observado na análise dos pacientes com segunda infecção. Em pacientes com segunda infecção por *Leishmania*, a concentração de IL-6 foi pouco menor que na infecção primária, mas sem diferença significativa entre os dois grupos. Não foi observada diferença na concentração de IL-6 na comparação das três espécies estudadas.

A IL-4 produzida, sobretudo por linfócitos T, demonstrou sua ação moduladora do sistema imune em modelo murino, por regular a secreção ou os efeitos de proteção de citocinas específicas da resposta  $T_H1$  como IFN- $\gamma$  e IL-12, sendo relacionada ao desenvolvimento de doença ativa neste modelo (MIRALLES et al., 1994). Outras citocinas, assim como o IL-4, apresentam atividade imunorreguladora, podendo suprir a capacidade microbicida dos macrófagos, inibindo sua capacidade de controle intracelular de crescimento do parasito (BARRAL et al., 1993). Pacientes com infecção primária por *Leishmania* apresentaram maior concentração dessa citocina quando comparado a indivíduos com segunda infecção ( $p=0,0086$ ) esses dados demonstram ativação de IL-4 no primeiro contato ao parasito e sua presença no curso clínico da infecção causada por diferentes espécies de *Leishmania*. No entanto, observou-se que infecção primária causada por *L. amazonensis* apresentou menor concentração de IL-4 quando comparado a *L. guyanensis* e *L. naiffi*.

A IL-10 desempenha função regulatória na resposta imune. Os principais alvos dessa citocina vão desde a inibição de mediadores inflamatórios até a produção de respostas  $T_H1$ ,  $T_H2$  e a ativação de monócitos (SIEWE et al., 2006; SABAT, 2010). Alguns estudos indicam que a produção de IL-10 por células T CD4 CD25 (Treg) está relacionada com a persistência da *Leishmania* e reativação da doença (MENDEZ et al., 2004; BELKAID, 2007; BITTAR et al., 2007). Estudos com camundongos nocauteados (*knock-out*) para IL-10 infectados com baixa dose de parasitos desenvolveram resposta imune aumentada e eliminação total dos parasitos. Esses camundongos perderam a imunidade à reinfecção, sugerindo, portanto, que a persistência parasitária é necessária para manter a imunidade (BELKAID et al., 2001; 2002;

KAYE; SCOTT, 2011). A secreção de IL-10 por células T<sub>H</sub>1, seria, portanto, um mecanismo autorregulatório que minimiza a imunopatologia na LTA (NULÉN; GAUTAN, 2010; CASTRO, 2011). Neste estudo, menor concentração de IL-10 foi observada no grupo com segunda infecção quando comparado aos primo-infectados. Infecção por *L. guyanensis* apresentou maior concentração de IL-10 quando comparado à infecção *L. amazonensis* (p=0,0085) e *L. naiffi* (sem significância estatística) tais resultados sugerem um perfil misto de resposta (T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2) na infecção por *L. guyanensis*. Particularmente, alguns pacientes infectados por *L. guyanensis* (MHOM/BR/11/IM5749 MHOM/BR/11/IM5752; MHOM/BR/11/IM5775) apresentaram maior concentração de IL-10 quando comparado a outros indivíduos com infecção pela mesma espécie. Em dois desses pacientes verificou-se maior número de lesões (4 lesões) e tempo de evolução da doença em torno de 21 dias. Reis et al. (2009) demonstraram maior produção de IFN- $\gamma$  e menor produção de IL-10 em pacientes com infecção por *L. braziliensis* antes do tratamento, entretanto após o tratamento as concentração de IFN-  $\gamma$  caíram e IL-10 aumentou, tais resultados sugerem que infecções causadas por *L. braziliensis* não apresentam mesmo perfil imunológico que o observado em *L. guyanensis* nesse estudo.

Atualmente, não existe nenhuma maneira de prever em quem as formas mais graves da doença se desenvolverá (SCOTT, 2011). Esses resultados demonstram a ação de algumas citocinas envolvidas no curso clínico LTA e como o desequilíbrio das mesmas e a relação parasito/hospedeiro podem interferir na cura ou no desenvolvimento de recidivas e formas mais graves da doença.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, em especial a Roberto Dantas de Farias pelo auxílio no transporte da equipe a Rio Preto da Eva e ao microscopista do Hospital deste município, Antônio José Barros da Silva, por todo apoio durante o período de realização do trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALEXANDER, WS.; HILTON, DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol.* 22:503-29, 2004.
02. AREVALO, J.; RAMIREZ, L.; ADAUI, V.; ZIMIC, M.; TULLIANO, G.; MIRANDA-VERÁSTEGUI, C. et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis.* 195:1846-51, 2007.
03. BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 70:6734-40, 2002.
04. BACELLAR, O.; FARIA, D.; NASCIMENTO, M.; CARDOSO, TM.; GOLLOB, KJ.; DUTRA, WO.; SCOTT, P.; CARVALHO, EM. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* Jul 1; 200(1):75-8, 2009.
05. BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDIZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor  $\beta$  as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.90, p.3442-3446, 1993.
06. BARRETT, TV, Senra MS. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. *Parasitol Today.* Aug; 5(8):255-7. 1989.

07. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial. Brasília: MS, p 136, 2006.
08. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Serie A. *Normas e Manuais Técnicos*. 2 ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; p. 180, 2007.
09. BELKAID, Y.; PICCIRILLO, CA.; MENDEZ, S.; SHEVACH, EM.; SACKS, DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. Dec 5;420(6915):502-7, 2002.
10. BELKAID, Y.; HOFFMANN, KF.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, MC.; WYNN, TA.; SACKS, DL. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*. Nov 19; 194(10):1497-506, 2001.
11. BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*. Nov;7(11):875-88, 2007.
12. BITTAR, RC.; NOGUEIRA RS, VIEIRA-GONÇALVES, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; MATTOS, MS.; OLIVEIRA-NETO, MP.; COUTINHO, SG.; DA-CRUZ, AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Aug; 102(5):625-30, 2007.
13. BOAVENTURA, VS.; SANTOS, CS.; CARDOSO, CR.; DE; ANDRADE, J.; DOS; SANTOS, WL.; CLARENCIO, J. et al. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol*. Oct; 40(10):2830-6, 2010.

14. BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal of Parasitology*, Oxford, v.28, n.1, p.121-134, Jan., 1998.
15. BUENO, LL.; MORAIS, CG.; LACERDA, MV.; FUJIWARA, RT.; BRAGA, EM. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. *Acta Trop.* Jul; 123(1):53-7, 2012.
16. CASTRO, H.; TEIXEIRA, F.; ROMAO, S.; SANTOS, M.; CRUZ, T.; FLÓRIDO, M.; APPELBERG, R.; OLIVEIRA, P.; FERREIRA-DA-SILVA, F.; TOMÁS, AM. *Leishmania* mitochondrial peroxiredoxin plays a crucial peroxidase-unrelated role during infection: insight into its novel chaperone activity. *PLoS Pathog.* Oct; 7(10):e1002325, 2011.
17. CUPOLILLO, E. Perfil enzimático e análise numérica de variantes do gênero *Leishmania* encontrados no novo mundo. Rio de Janeiro [Dissertação de Mestrado- Instituto Oswaldo Cruz ], 1992.
18. DEGROSSOLI, A.; ARRAIS-SILVA, WW.; COLHONE, MC.; GADELHA, FR.; JOAZEIRO, PP.; GIORGIO, S. The influence of low oxygen on macrophage response to *Leishmania* infection. *Scand J Immunol.* Aug; 74 (2):165-75, 2011.
19. GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmanose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p.71-80, Jan-Feb., 2003.
20. GUERRA, JÁ.; PRESTES, SR.; SILVEIRA, H. et al. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 5: 980, 2011.
21. GUIMARÃES, VCFV. Avaliação da infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco. Pernambuco [Dissertação de Mestrado-Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães], 2011.

22. KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*, v.166, p.1141-1147, 2001.
23. KAY, E. P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. Jul 11; 9(8):604-15, 2011.
24. KIMA, PE.; SOONG, L. Interferon gamma in leishmaniasis. *Front Immunol*. Jun 19; 4:156, 2013.
25. KOLLS, JK.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004 Oct; 21(4):467-76, 2004.
26. KOSTKA, SL.; DINGES, S.; GRIEWANK, K.; IWAKURA, Y.; UDEY, MC.; VON, STEBUT. E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol*. March 1; 182(5): 3039–3046, 2009.
27. LAINSON, R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 18:47-56, 1985.
28. LATIFYNIA, A.; KHAMESIPOUR, A.; BOKAIE, S.; KHANSARI, N. Antioxidants and proinflammatory cytokines in the sera of patients with cutaneous leishmaniasis. *Iran J Immunol*. Sep; 9(3):208-14, 2012.
29. LEE, WW.; KANG SW, CHOI. J.; LEE, SH.; SHAH, K.; EYNON, EE.; FLAVELL, RA.; KANG, I. Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor. *Blood*. Jan 21; 115(3):530-40.LEE et al., 2010.
30. LIBÓRIO, AB.; DAHER, EF. Renal function evaluation in patients with American Cutaneous Leishmaniasis after specific treatment with pentavalent antimonial. *BMC Nephrology*.13:44, 2012.
31. LIEW, FY. The role of innate cytokines in inflammatory response. *Immunol Lett*. Jan 22; 85(2):131-4, 2003.

33. MATTA, NE.; NOGUEIRA, RS.; FRANCO, AM.; DE; SOUZA, E.; SOUZA, I.; MATTOS, MS.; OLIVEIRA-NETO, MP. et al. *Leishmania (Viannia) guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland. *Am J Trop Med Hyg.* 80:339-44, 2009.
33. MAUËL, J. Vaccination against *Leishmania* infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* Oct; 2(3):201-26, 2002.
34. MENDE,Z S.; RECKLING, SK.; PICCIRILLO, CA.; SACKS, D.; BELKAID, Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med.* Jul 19; 200(2):201-10, 2004.
35. MIRALLES, G.D.; STOECKLE, M.Y.; McDERMOTT, D.F.; FINKELMAN, F.D.; MURRAY, H.W. Th1 e Th2 Cell- associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, v.62, n.3, p.1058-1063, 1994.
36. MURRAY, H.W.; SQUIRES, K.E.; MIRALLES, C.D.; STOECKLE, M.Y.; GRANGER, A.M.; GRANELLI-PIPERNO, A.; BOGDAN, C. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol*, v.148, p.1858-1863, 1992.
37. MURRAY, H.W.; LU, C.M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R.T. Interleukin- 10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun*, v.70, n.11, p.6284-6293, 2002.
38. NAIFF, MF.; CUPOLILLO, E.; NAIFF, RD.; MOMEN, H.; BARRET, TV.; GRIMALDI, JR. G. Leishmaniose tegumentar americana na Amazônia: distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. *Rev Soc Bras Med Trop.* 32 Suppl 1:243, 2, 1999.
39. NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* May;2(2):135-46, 2010.
40. NICOLE, GL. Culture du parasite du Bouton d'Orient. *CR Acad Sci.* 146:842-3, 1908.

41. NOVY, FGE.; MACNEAL, WJ. On the cultivation of Trypanosome brucei. *J Infect Dis New York*. 1:1-30, 1904.
42. OLIVEIRA, RA.; LIMA, CG.; MOTA, RMS.; MARTINS, AMC.; SANCHES, TR.; SEGURO, AC.; ANDRADE, LC.; SILVA, JUNIOR, GB.; ALEXANDRE, B.; . Renal function evaluation in patients with American Cutaneous Leishmaniasis after specific treatment with pentavalent antimonial. *BMC Nephrology*, 13:44, 2012.
43. PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57BL/6 mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 102, 79–82, 2007.
44. RAUTAJOKI, K. J.; KYLANIEMI, M. K.; RAGHAV, S. K., RAO, K.; LAHESMAA, R.. An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation. *Ann. Med*. 40, 322–335, 2008.
45. REINER, SL.; LOCKSLEY, RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*. 13: 151-77, 1995.
46. REIS, LC.; BRITO, MEF.; SOUZA, MA.; MEDEIROS, ACR.; SILVA, CJ.; LUNA, CF.; PEREIRA, VRA. Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. *J Clin Lab Anal*. 23: 63-69, 2009.
47. ROMERO, GA.; GUERRA, MV.; PAES, MG.; MACÊDO, VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg.*; 65:456-65, 2001.
48. SABAT, R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010 Oct;21(5):315-24, 2010.
49. SIEWE, L.; BOLLATI-FOGOLIN, M.; WICKENHAUSER, C.; KRIEG. T.; MÜLLER, W.; ROERS, A. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the

inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. *Eur J Immunol.* Dec; 36(12):3248-55, 2006.

50. SILVEIRA, FT.; ISHIKAWA, EA.; DE; SOUZA, AAA.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*, 85: 43-50, 2002.

51. SILVEIRA, FT.; LAINSON, R.; CORBETT, CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99: 239-251, 2004.

52. SILVEIRA, FT.; MÜLHER, SR.; SOUZA, AA.; LAINSON, R.; GOMES, CM.; LAURENT, MD. et al. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. *Rev Para Med* 22: 9-20, 2008.

53. SCOTT, P. *Leishmania*-a parasitized parasite. *N Engl J Med.* May 5;364(18):1773-4, 2011.

54. TALHARI, CHRUSCIAK. A. Pesquisa clínica para avaliar a eficácia e segurança da miltefosina oral em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania guyanensis*, comparada ao tratamento com antimonial pentavalente [tese]. Manaus (AM): Universidade do Estado do Amazonas/Fundação de Medicina Tropical do Amazonas; 132p, 2009.

55. TALHARI, AC.; DIETZE, R.; TALHARI, CC.; DA; SILVA, RM.; GADELHA, Y. EP.; DE.; OLIVEIRA, PENNA, G.; LIMA, M. PR.; TALHARI, S. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 84:255–260, 2011.

56. TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med*, v.204, n.2, p.239-43, 2007.
57. TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, v.3, n.2, p.133-46, 2003.
58. TRINCHIERI, G.; RENGARAJU, M.; D'ANDREA, A.; VALIANTE, N.M.; KUBIN, M.; ASTE, M.; CHEHIME, J. Producer cells of interleukin-12. *Immunol Today*, v.14, p.237-238, 1993.

### 3. DISCUSSÃO GERAL

O sistema imune atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares. A geração de uma resposta imune adequada durante processo infeccioso é o ponto crucial para direcionar a progressão ou cura da doença; ou ainda, no caso específico das leishmanioses, para um padrão assintomático da infecção. A resposta imune à *Leishmania* é iniciada no local de entrada do parasito através das células sentinelas, onde as formas promastigotas são interiorizadas, promovendo a ativação da resposta (GORDON; HELMING; MARTINEZ, 2009).

As células hospedeiras das espécies de protozoários do gênero *Leishmania* desempenham um papel fundamental para promover o elo ideal entre a imunidade inata e adaptativa, e o grau de virulência do parasito poderá influenciar em três pontos cruciais da indução da resposta adaptativa adequada; (i) a apresentação antigênica, (ii) a expressão de moléculas co-estimuladoras e a produção de citocinas. Nesse contexto, subconjuntos distintos de células T CD4<sup>+</sup> podem ser gerados a partir da estimulação por células apresentadoras de antígenos (APCs) infectadas (BOGDAN, 2000; GORDON, 2002; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; RITTIG; TRINCHIERI; SHER, 2007).

Em seres humanos, as características do parasito e da resposta imune do hospedeiro definem a ampla diversidade de formas clínicas da infecção causada por *Leishmania*, porém, independente de qual seja a espécie envolvida, a cura clínica é obtida após indução de eficiente resposta imune celular (CÁCERES-DITTMAR et al., 1993; CONVIT et al., 1993; PIRMEZ et al., 1993; SILVEIRA et al., 2004, 2009). Já é bem consolidado que os parasitos do gênero *Leishmania*, especialmente na LC, induzem um padrão de citocinas pró-inflamatórias relacionadas com o perfil T<sub>H</sub>1, como IL-12, TNF e IFN- $\gamma$ , por macrófagos e

outras células do sistema imunológico em hospedeiros resistentes (JERONIMO; PEARSON; WILSON, 2005; BOGDAN; LIESE; SCHLEICHER, 2008). Como descrito anteriormente, outro subconjunto pró-inflamatório conhecido por ter um papel importante em algumas infecções intracelulares é o perfil T<sub>H</sub>17 (VAN et al., 2009). A diferenciação desse padrão efetor requer a presença das citocinas IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-23 no microambiente inflamatório durante processo infeccioso causado por diferentes microorganismos (SOUMELIS; VOLPE, 2008).

Nesse trabalho, foi demonstrado que a infecção por *L. (V.) guyanensis* induz a liberação de citocinas, tanto de perfil T<sub>H</sub>1 (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) como de perfil T<sub>H</sub>2 (IL-4, IL-6), regulatórias (IL-10) e T<sub>H</sub>17 (IL-17). Contudo, citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN- $\gamma$ ) apresentaram maior concentração nas amostras antes do tratamento quando comparadas aos controle, e com amostras após término do tratamento. Observou-se também que infecções causadas por *L. (L.) amazonensis* apresentam maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias quando comparado aos controles, no entanto, essa concentração foi menor na comparação com as outras espécies (*L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiiffi*).

Na infecção por *L. (V.) guyanensis*, algumas citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  parecem desempenhar importante papel na resolução da doença. Suas concentrações são maiores quando comparada à população controle tanto antes do tratamento (AT) como pós-tratamento (PT) e cicatrização da lesão. Maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> também foi observado ao fim do tratamento quando comparado aos controles, atestando assim, a presença de um tipo de resposta celular na infecção. Entretanto, a porcentagem de células T regulatórias e NKT, bem como, a concentração de IL-5 foi menor nos dois momentos (AT e PT) quando comparado aos controles.

Embora a polarização do perfil T<sub>H</sub>17 inflamatório esteja relacionada com a patogênese de várias auto-imunidades e doenças inflamatórias crônicas, como

encefalomielite, esclerose múltipla e sistêmica, psoríase, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico (KURASAWA et al., 2000; LANGRISH et al., 2005; WILSON et al., 2007), esquistossomose e LC por *L. (L.) major* (LOPEZ et al., 2009), nesse estudo o papel da IL-17 parece ser crucial na imunidade da LC por *L. (V.) guyanensis*, uma vez que seus níveis foram evidentemente maiores nos dois momentos analisados (AT e PT) quando comparados aos controles.

Bacellar et al. (2009), observaram que IL-17 é produzida durante infecção por *L. (V.) braziliensis* em humanos. Linfócitos obtidos de pacientes com leishmaniose mucosa e leishmaniose cutânea produziram níveis mais elevados de IL-17 que linfócitos obtidos a partir de indivíduos não infectados. Houve uma tendência para o tecido obtido a partir de pacientes com a forma mucosa em conter maior número de células que expressam IL-17 em comparação com os tecidos obtidos de pacientes com a forma cutânea, e havia correlação direta entre o número de células que expressavam IL-17 e a presença de inflamação no local da lesão, confirmando assim o papel desta citocina na patogênese da reação inflamatória na leishmaniose, o que talvez, poderia explicar a associação da *L. (V.) guyanensis* em formas mais graves da doença como a leishmaniose mucocutânea, uma vez que a concentração dessa citocina continua elevada mesmo após cura clínica da infecção.

Já se sabe que a IL-10 atua em ambos os sistemas, inato e adaptativo regulando a resposta imunológica e minimizando a lesão tecidual (BOND; FIORENTINO; MOSMANN, 1989). Há inúmeros estudos que demonstram íntima relação entre a produção de IL-10 com a susceptibilidade do hospedeiro e exacerbação da leishmaniose (CARVALHO et al., 1989; GHALIB et al., 1993; MURRAY, 2001; BELKAID et al., 2001; ALEXANDER; FARRELL, 2003; ALEXANDER; BRYSON, 2005; WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005; JANKOVIC; TRINCHIERI, 2007; NYLEN; SACKS, 2007). Além disso, o papel regulador da IL-10 influencia negativamente a capacidade proliferativa de linfócitos e, portanto, a IL-10

é considerada uma citocina reguladora (GHALIB et al., 1993; NYLEN; SACKS, 2007; GAUTAM et al., 2011). Assim, a regulação positiva de IL-10 nos pacientes estudados parece ser um componente determinante na diminuição da inflamação. A concentração nos níveis séricos dessa citocina foi maior nas amostras antes do tratamento em indivíduos infectados por *L. (V.) guyanensis* quando comparada às infecções por *L. (V.) naiffi* e *L. (L.) amazonensis*, no entanto, a concentração de INF- $\gamma$  em *L. guyanensis* também foi maior. Estudos experimentais em camundongos com *L. (L.) major* e outros agentes infecciosos mostram que a IL-10 também pode ser produzida por células T<sub>H</sub>1 polifuncionais, como um mecanismo de imunorregulação durante fortes reações inflamatórias (ANDERSON et al., 2007; JANKOVIC; TRINCHIERI, 2007).

Dados da literatura mostram que a presença de TGF- $\beta$  e IL-6 leva a concomitante produção de IL-10 e a regulação positiva de células T<sub>H</sub>17, bem como da citocina IL-17. Esse fato parece estar envolvido com a manutenção da homeostase, e sugere que ambas IL-17 e IL-10 são dependentes de TGF- $\beta$  e IL-6 (MCGEACHY et al., 2007; DIVEU; MCGEACHY; CUA, 2008). Neste estudo, nas infecções por *L. (V.) guyanensis* foi verificado maior na concentração das citocinas IL-6, IL-10 e IL-17 nos dois momentos, AT e PT, na comparação com grupo controle, porém, nas amostras pós-tratamento observa-se menor concentração sérica das mesmas.

Citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  podem facilitar a proliferação do parasito (CARVALHO; SCHRIEFER; WILSON, 2008; ASSIS et al., 2013) que na sua forma promastigota estimula a produção de IFN- $\gamma$  por NK (NYLEN et al., 2003). IFN- $\gamma$  por sua vez, ativa os macrófagos que desempenham papel crucial na morte do parasito e resolução da infecção (CARVALHO, SCHRIEFER; WILSON, 2008). No entanto, alguns autores demonstram que mesmo na presença de citocinas como IFN- $\gamma$  a doença pode progredir e apresentar comprometimento das mucosas (CARVALHO et al., 2007, GAZE; DUTRA;

LESSA, 2006). A produção do IFN- $\gamma$  parece estar associada tanto a cura como ao agravamento da lesão (SALHI et al., 2008). Em infecções causadas por *L. (V.) braziliensis*, foi verificado presença da IL-10 na fase inicial da infecção e associação dessa citocina com persistência parasitária (SALHI et al., 2008). À medida que a infecção por *L. (V.) braziliensis* progride, os níveis de IFN- $\gamma$  aumentam e predominam sobre os níveis de IL-10 (GOMES-SILVA et al., 2007). Nesse trabalho, o mesmo não foi observado, uma vez que as concentrações de IFN- $\gamma$  nas amostras após-tratamento apresentaram ligeira queda na suas expressões.

O aumento na produção de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em infecções por *L. (V.) braziliensis* parece contribuir para a imunopatologia da doença e estão associados a um tipo de resposta imune exagerada (RUIZ; BECKER 2007). Nesse trabalho, foi verificado que infecções por *L. (V.) guyanensis* apresentam baixa produtividade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos dois momentos AT e PT, quando comparados com a população controle. Isso poderia explicar alguns aspectos peculiares das infecções causadas por *L. (V.) guyanensis* quando comparado a *L. (V.) braziliensis*, sendo que essa última parece apresentar resposta imune mais exacerbada e está relacionada com maior comprometimento de mucosa (CARVALHO et al., 2012; SALHI et al., 2008). Tal aspecto é evidenciado por Leopoldo et al. (2006), que relatam que na LC e LM causada por *L. (V.) braziliensis* existe um forte desvio T<sub>H</sub>1 e, embora o número de parasitos no tecido seja escasso ou até ausente, há desenvolvimento de lesão. Células mononucleares de sangue periférico de indivíduos com LTA estimuladas com antígeno de *L. (V.) braziliensis* produzem grande quantidade de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , e pouca IL-10. Como habitualmente o sistema imune não consegue destruir completamente as leishmanias, essa forte resposta T<sub>H</sub>1 termina por levar a ocorrência de uma reação inflamatória muito intensa e a dano aos tecidos próprios, resultando no aparecimento de úlceras na pele e na mucosa (VIEIRA et al., 2013). Tem participação importante nesse dano tecidual a produção acentuada de TNF- $\alpha$  e de NO.

Evidências de que a resposta imune celular participa da patogenia da LC e LM incluem: a) o tratamento precoce da infecção não impede o aparecimento da lesão (MACHADO et al., 2002; 2007); b) existência de forte reação inflamatória no tecido com maior concentração de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e poucos parasitos na lesão (RIBEIRO DE JESUS et al., 1998; PIRMEZ et al., 1993; MACHADO et al., 2002; MATTNER et al., 2004); c) associação de antimonial com droga inibidora de TNF- $\alpha$  cura pacientes com leishmaniose mucosa que são refratários ao tratamento com antimonial (LESSA et al., 2001; MACHADO et al., 2007).

O reconhecimento do parasito e a produção de citocinas são os dois principais mecanismos estimulatórios para as células NK, e ambos estimulam suas respostas efetoras (ALLI; KHAR, 2004). O principal mecanismo de ativação das células NK se dá através de interação do lipofosfoglicano (LPG) do parasito com receptor TLR-2 (Becker et al., 2003) e apesar das células NK não serem essenciais para o controle final da LC (BOGDAN, 2001; PRAJEETH et al, 2011) elas podem induzir atividade leishmanicida dos macrófagos e ajudar na preparação de resposta de células T de proteção (BOGDAN, 2001; KELLY; STETSON; LOCKSLEY, 2003 ; LAOUAR et al. 2005; PEREIRA et al., 2009; PRAJEETH et al, 2011). Correlação significativa entre valores de NKT na infecção por *L. (V.) guyanensis* foi verificado nesse trabalho, menor porcentagem desse tipo celular foi observada nas amostras de pacientes infectados antes do tratamento quando comparado com população controle. Entretanto, nas amostras analisadas após término do tratamento foi verificado maior percentual de NKT, demonstrando que a infecção por *L. (V.) guyanensis* desempenha supressão desse tipo celular durante processo infeccioso.

Um desequilíbrio entre as populações celulares circulantes poderia estar envolvido na imunopatogenia da LTA. Soares et al. (2006), demonstraram que pacientes com leishmaniose cutânea localizada apresentaram elevado número de monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>

no sangue periférico quando comparado com controles sadios, e uma associação entre o número dos monócitos CD16<sup>+</sup> e a gravidade da doença foi relatada. Na análise de monócitos (CD14<sup>+</sup>) e monócitos ativados (CD14<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>) desse trabalho, foi verificado que monócitos ativados CD14<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> apresentam maior porcentagem na infecção por *L. (V.) guyanensis* quando comparado com indivíduos não infectados, especialmente nas amostras após término do tratamento.

A presença de resposta imune humoral de perfil T<sub>H</sub>2 na Leishmaniose tegumentar parece estar relacionada à persistência e cronicidade da doença; e a presença de citocinas IL-4 e IL-5 está relacionada à susceptibilidade ao parasito (SCOTT et al, 1988; SCOTT et al, 1989). Turetz et al. (2002), observaram que os pacientes com leishmaniose disseminada também produziam mais IL-5 e IL-10 que os pacientes portadores de LC. Esses achados sugerem que a disseminação das lesões está relacionada a uma supressão inicial da resposta protetora T<sub>H</sub>1, com proliferação do parasito (CARVALHO et al, 1994).

Nesse estudo, foi verificado que as concentrações de IL-5 nas amostras antes do início do tratamento nos pacientes com LC causada por *L. (V.) guyanensis* apresentavam-se baixas, enquanto que IL-4 e IL-10 estavam elevadas. Após o término do tratamento, as concentrações de IL-4 eram mais altas que nas amostras pré-tratamento e controles, ressaltando a presença de IL-4 após a cura clínica nas infecções por *L. (V.) guyanensis*, em desacordo com o observado por Brelaz-de-Castro et al. (2012) que verificaram que pacientes com LC causada por *L. (V.) braziliensis* induziam altas concentrações de IL-4 na fase inicial da doença e antes do tratamento, contudo, ao término do tratamento e com a cura clínica da lesão, as concentrações de IL-4 diminuía e ficavam próximas ao observado na população controle.

As porcentagens de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) estavam aumentadas antes do tratamento, no entanto, após o termino do tratamento seu valor apresentou concentração muito próxima

do observado na população controle. Mostrando assim, a presença desse perfil celular durante processo infeccioso por *L. (V.) guyanensis*.

As células T reguladoras executam um papel geral na regulação imune, controlando a infecção e exacerbação da resposta, mas ao mesmo tempo regulam o sistema impedindo a cura estéril no intuito de impedir a reativação da doença (BELKAID et al., 2002; FALCÃO et al., 2012). Os mecanismos utilizados pelas Tregs para exercerem a função supressora ainda não foram totalmente esclarecidos, bem como seu papel nas infecções por leishmanias (SOJKA; HUANG; FOWELL 2008). Estudo realizado por Falcão et al. (2012), demonstrou presença desse tipo celular em camundongos BALB/c infectados por *L. (V.) braziliensis*, mesmo após cura clínica. Nos pacientes aqui estudados com infecção por *L. (V.) guyanensis*, foi visto que as células T regulatórias ( $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ ) apresentam acentuada queda nas amostras antes do tratamento quando comparadas com população controle e seu número tende a aumentar após término do tratamento, no entanto, não atinge a mesma porcentagem que a população sadia. Esses dados sugerem que na infecção por *L. (V.) guyanensis*, este atua de forma a suprimir a diferenciação desse grupo celular durante processo infeccioso, e novos estudos devem ser realizados a fim de se conhecer os mecanismos que levam ao controle ou à persistência dos parasitos no hospedeiro humano.

Os pacientes deste estudo foram provenientes de áreas consideradas endêmicas da doença. Foi observada maior prevalência de LTA em indivíduos do sexo masculino e adultos jovens. Este perfil de ocorrência é encontrado no país, onde a doença atinge predominantemente indivíduos do sexo masculino em idade produtiva (BRASIL, 2007). Nesse estudo, o exame direto na borda das lesões suspeitas de LTA apresentou um significativo índice de positividade (83%), ao contrário de outros trabalhos, onde a média é em torno de sessenta por cento (BRASIL, 2007; BRITO et al., 2000, 2001; REIS et al., 2009; SAMPAIO et al., 2002).

Cerca de 10% dos indivíduos que vivem em área endêmica para LTA causada por *L. (V.) braziliensis* apresentam positividade para o teste de IDRM (Carvalho et al., 2012). Nesse trabalho, o teste de IDRM apresentou 92% de positividade nos pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis*, contudo, cinco indivíduos não retornaram para a leitura do exame, o que dificultou a avaliação da efetividade do teste, evidenciando assim a dificuldade do uso do IDRM no diagnóstico da LTA. A sorologia para IgG e IgM, bem como o cultivo parasitário e inoculação em hamster apresentaram 100% de positividade, entretanto, é importante ressaltar que o diagnóstico utilizando meio de cultivo e inoculação em hamster está disponível nos grandes centros de pesquisa, não estando usualmente acessível aos serviços de saúde.

Ainda que em todos os pacientes tenha sido possível detectar a presença de anticorpos IgM e IgG produzidos contra o antígeno homólogo de *Leishmania*, e valores em torno de 92% de positividade para IDRM, exames parasitológicos ainda são considerados métodos *gold standard* no diagnóstico da doença.

Embora a resposta imune seja fundamental para a defesa contra a maioria de agentes infecciosos, muitas evidências têm se acumulado nos últimos anos quanto aos principais aspectos patológicos de diversas doenças infecciosas, referindo-se a estes como não relacionados a uma ação direta do agente agressor, mas sim como sendo uma resposta imune anormal (SINGH; TRIPATHI; NAIK, 2007; KAYE; SCOTT, 2011). Nos seres humanos os mecanismos da imunidade celular desempenham um importante papel no controle das infecções por *Leishmania* spp. e no sucesso do tratamento (NAIK; INGH; TRIPATHI, 2007; KAYE; SCOTT, 2011; CARVALHO et al., 2012). Estudos que busquem elucidar a relação entre parasito x resposta imune no hospedeiro humano devem ser realizados a fim de compreender a dinâmica dessa doença endêmica em diversos continentes, mas que no Brasil, em particular, possui um número diverso de formas clínicas e agentes causais.

#### 4. CONCLUSÕES

✓ Ficou demonstrada a presença de perfil misto de resposta imune  $T_H1/T_H2/T_H17$  na infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis*;

✓ Constatou-se presença de citocinas e células de perfil  $T_H1/T_H2/T_H17$  na infecção por *L. (V.) guyanensis* após cura clínica por tratamento quimioterápico com antimonial pentavalente, sugerindo a persistência parasitária nos pacientes estudados sendo muitas vezes necessária para a manutenção da imunidade. A possibilidade de persistência parasitaria pode ser reforçada pela demonstração da produção de IL10 por células T  $CD4^+ CD25^+$  (Treg) no pós-tratamento com antimonial;

✓ Várias sugestões tem sido feitas com relação aos efeitos dos antimoniais na resposta imune, e geralmente o argumento é de que estes agentes se beneficiam de citocinas pró-inflamatórias para estimular adequadamente os macrófagos. Neste estudo foi detectada a manutenção ou maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias após cura-clínica, da mesma forma que se evidencia o aumento no percentual de monócitos ativados. Estes dados em conjunto, sugerem que por algum mecanismo os monócitos continuam sendo ativados e que algumas destas citocinas estejam sendo produzidas. A IL-12 e IFN- $\gamma$  apresentaram menores concentrações no pós-tratamento, sugerindo a regulação da resposta imune e a redução da carga parasitaria por morte celular;

✓ As células T Natural Killer (NKT) representam um raro subtipo de linfócito T considerado parte do sistema imune inato. Expressam também marcadores de células NK o que as coloca na interface entre a imunidade inata e a adaptativa. Neste estudo verificou-se redução no percentual dessas células no sangue periférico dos indivíduos infectados com *L. (V.) guyanensis* quando comparados ao grupo controle demonstrando provável supressão destas células na infecção ativa por esta espécie de *Leishmania*;

✓ A intradermorreação de Montenegro utilizando antígeno do Ministério da Saúde demonstrou eficácia em mais de 90% dos testes realizados, entretanto, não pode ser considerado um teste de diagnóstico uma vez que indivíduos com cura clínica geralmente são reativos. Outro problema relacionado a este exame refere-se ao difícil retorno para leitura da área de endurecimento do teste, que se apresentou neste estudo como fraco, médio e fortemente reativo;

✓ A infecção por *L. (Leishmania) amazonensis* apresentou menor concentração de citocinas pró-inflamatórias, regulatórias e de perfil T<sub>H</sub>17 quando comparado à infecção pelas outras duas espécies, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi*, demonstrando a variabilidade da resposta imune de acordo com a espécie de leishmania.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACOSTA-RODRIGUEZ EV, NAPOLITANI G, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immuno.* 8: 942–949, 2007.
2. AEBISCHER, T. Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites? *Parasitology Today*, Oxford, v. 10, n. 1, p. 25-28, Jan. 1994.
3. AFONSO, L.; BORGES, VM.; CRUZ, H.; RIBEIRO-GOMES, FL.; DOSREIS, GA.; DUTRA, NA.; CLARÊNCIO, J.; DE, OLIVEIRA, CI., BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, CI. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol.* Aug; 84(2):389-96, 2008.
4. AJDARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, MH.; ESLAMI, MB.; KEMP, K.; KHARAZMI, A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun.* Apr;68(4):1760-4, 2000.
5. AKOPYANTS, NS.; KIMBLIN, N.; SECUNDINO, N.; PATRICK, R.; PETERS, N.; LAWYER, P.; DOBSON, DE, BEVERLEY, SM.; SACKS, DL. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science.* Apr 10; 324(5924):265-8, 2009.
6. ALBERT, SCHRIEFER.; MARY, E. WILSON, E EDGAR M. CARVALHO. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* Oct; 21(5):483-8, 2008.
7. ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T HELPER (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett.* Jun 15;99(1):17-23, 2005.
8. ALLI, RS.; KHAR, A. Interleukin-12 secreted by mature dendritic cells mediates activation of NK cell function. *FEBS Lett*, 559, 71-76, 2004.
9. ALVAR, J.; VÉLEZ, ID.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN, BOER.; M, WHO. Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 7(5):e35671, 2012.
10. ANDERSON, CF.; OUKKA, M.; KUCHROO, VJ.; SACKS, D. CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(-)</sup>Foxp3<sup>(-)</sup> Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* Feb 19;204(2):285-97, 2007.
11. ANTINORI, S.; CALATTINI, S.; PIOLINI, R.; LONGHI, E.; BESTETTI, G.; CASCIO, A.; PARRAVICINI, C.; CORBELLINO, M. Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? *Am J Trop Med Hyg*, 81: 46–51, 2009.

12. ANTONELLI, LR.; DUTRA, WO.; ALMEIDA, RP.; BACELLAR, O.; CARVALHO, EM.; GOLLOB, KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* Nov 15;101(2):226-30, 2005.
13. ARANA, BA.; MENDOZA, CE.; RIZZO, NR.; KROEGER, A. Randomized, controlled, doubleblind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus ethylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg.* 65: 466-470, 2001.
14. ARANA, BA.; NAVIR, TR.; ARANA, FE.; BERMAN, JD.; ROSENKAIMER, F. Efficacy of a short course (10 days) of high-dose meglumine antimonate with or without interferon- $\gamma$  in treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Clin Infect Dis*, 18: 381-384, 1994.
15. AREVALO, J.; RAMIREZ, L.; ADAUI, V.; ZIMIC, M.; TULLIANO, G.; MIRANDA-VERÁSTEGUI, C.; LAZO, M.; LOAYZA-MURO, R.; DE, DONCKER, S.; MAURER, A.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, JC.; LLANOS-CUENTAS, A. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis.* Jun. 15;195(12):1846-51, 2007.
16. ASSIS, SM.; CASTRO, MC.; OLIVEIRA, AP.; ALMEIDA, AF.; ALMEIDA, TM.; REIS, LC.; MEDEIROS, ÂC.; DE, BRITO, ME.; PEREIRA, VR. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microb Pathog.* Apr; 57:27-32,2013.
17. AWASTHI, A.; MATHUR, RK.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res.* Jun; 119(6):238-58, 2004.
18. BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; JESUS, AR. et al. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. *Infect Immun*, 70: 6734–6740, 2002.
19. BACELLAR, O.; FARIA, D.; NASCIMENTO, M.; CARDOSO, THIAGO, M. GOLLOB.; KENNETH, J. et al. Interleukin 17 Production among Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases.* 200: 75–78, 2009.
20. BADARO, R.; JONES, TC.; CARVALHO, EM.; SAMPAIO, D.; REED, SG.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, WD. Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1986.
21. BANÛLS, AL.; HIDE, M.; TIBAYRENC, M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol.* Aug;29(8):1137-47, 1999.
22. BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg.* 44:536–54, 1991.
23. BARRAL-NETTO, M.; DA, SILVA, JS.; BARRAL, A.; REED, S. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. *Am J Pathol.* Mar;146(3):635-42, 1995.

24. BARRET, TV.; SENRA, MS. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. *Parasitol Today*. 5:255-7, 1989.
25. BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, RM.; CUBRÍA, JC.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol*. Apr;30(4):435-43, 1998.
26. BARROSO-FREITAS, APT.; PASSOS, SRL.; MOUTA-CONFORT, E.; MADEIRA, MF.; SCHUBACH, AO.; SANTOS, GPL.; NASCIMENTO, LD.; MARZOCHI, MCA.; MARZOCHI, KBF. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103: 383—389, 2009.
27. BATES, P.A., ROGERS, M.E. New insights into the development biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med*. 4, 601-609, 2004.
28. BATES, PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. Aug;37(10):1097-106, 2007.
29. BEDOYA-PACHECO, SJ.; ARAUJO-MELO, MH.; VALETE-ROSALINO, CM.; PIMENTEL, MI.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, AO.; MARZOCHI, MC. Endemic tegumentary leishmaniasis in Brazil: correlation between level of endemicity and number of cases of mucosal disease. *Am J Trop Med Hyg*. Jun;84(6):901-5, 2011.
30. BELKAID, Y.; HOFFMANN, KF.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, MC.; WYNN, TA.; SACKS, DL. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*. Nov 19; 194(10):1497-506, 2001.
31. BELKAID, Y.; PICCIRILLO, CA.; MENDEZ, S.; SHEVACH, EM.; SACKS, DL. CD4 + CD25 + células T reguladoras controle *Leishmania major* persistência e imunidade. *Nature*. 420 (6915): 502-7, 2002.
32. BITTAR, RC.; NOGUEIRA, RS.; VIEIRA-GONÇALVES, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; MATTOS, MS.; OLIVEIRA-NETO, MP.; COUTINHO, SG.; DA-CRUZ, AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Aug;102(5):625-30, 2007.
33. BOAVENTURA, VS.; SANTOS, CS.; CARDOSO, CR.; DE, ANDRADE, J.; DOS, SANTOS, WL. et al. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol*. 40: 2830–2836, 2010.
34. BOGDAN, C. GESSNER A, SOLBACH W, RÖLLINGHOFF M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Current Opinion in Immunology*, London, v. 8, p. 517-525, Aug. 1996.
35. BOGDAN, C. Leishmaniasis in rheumatology, haematology and oncology: epidemiological, immunological and clinical aspects and caveats. *Ann Rheum Dis*. 71(Supp II):i60–i66, 2012.
36. BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. Oct; 2(10):907-16, 2001.

37. BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal of Parasitology*, Oxford, v.28, n.1, p.121-134, Jan. 1998.
38. BOMFIM G, NASCIMENTO C, COSTA J, CARVALHO EM, BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. Nov;84(2):188-94, 1996.
39. BOULANGER, N.; LOWENBERGER, C.; VOLFF, P.; URSIC, R.; SIGUTOVA, L.; SABATIER, L.; SVOBODOVA, M.; BEVERLEY, SM.; SPÄTH, G.; BRUN, R.; PESSON, B.; BULET, P. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun*. Dec; 72(12):7140-6, 2004.
40. BOURREAU, E.; RONET, C.; COUPPIÉ, P.; SAINTE-MARIE, D.; TACCHINI-COTTIER, F.; LAUNOIS, P. IL-10 producing CD8+ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. *Microbes Infect*. Jul;9(8):1034-41, 2007.
41. BOURREAU, E.; RONET, C.; DARSISSAC, E.; LISE, MC.; MARIE, DS.; CLITY, E. et al. In leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis* infection, distinct intralesional interleukin-10 and Foxp3 mRNA expression are associated with unresponsiveness to treatment. *J Infect Dis*. 199;576-9, 2009.
42. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Edição. 182p. Ed. Ministério da Saúde. ([http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_lta\\_2ed.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf)), 2007.
43. BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Textos de Epidemiologia para vigilância ambiental em saúde/coordenação. Brasília, 2002.
44. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde: Leishmaniose Tegumentar Americana. 2010. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf> >. Acesso em: 23/07/2013.
45. BRELAZ-DE-CASTRO, MC.; DE, ALMEIDA, AF.; DE, OLIVEIRA, AP.; DE, ASSIS-SOUZA, M.; DA, ROCHA, LF.; PEREIRA, VR. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol*. Oct; 279(2):180-6, 2012.
46. BRITO, ME.; MENDONÇA, MG.; GOMES, YM.; JARDIM, ML.; ABATH, FG. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Mar-Apr;95(2):203-6, 2001.
47. BRITO, ME.; MENDONÇA, MG.; GOMES, YM.; JARDIM, ML.; ABATH, FG. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*. Mar;7(2):318-21, 2000.
48. BRODSKYN, CI.; BARRAL, A.; BOAVENTURA, V.; CARVALHO, E.; BARRAL-NETTO, M. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol*. Nov 1;159(9):4467-73, 1997.

49. BRODSKY, CI. CD8 (+) granzima B (+) lesão tecidual contra CD4 (+) IFN- $\gamma$  (+)-Mediated Matar Parasite em Cutâneo Humano Leishmaniose. *J Invest Dermatol* . Junho 2013, 133 (6) :1533-40, 2013.
50. BUXBAUM, LU.; SCOTT, P. Interleukin 10- and Fc $\gamma$  receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infect Immun*. 73: 2101–2108, 2005.
51. BUXBAUM, LU. *Leishmania mexicana* Infection Induces IgG to Parasite Surface Glycoinositol Phospholipids that Can Induce IL-10 in Mice and Humans. *PLoS Negl Trop Dis*. May 9;7(5):e2224, 2013.
52. CACERES-DITTMAR, G.; TAPIA, FJ.; SANCHEZ, MA.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; MODLIN, RL.; BLOOM, BR, CONVIT J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol*. 91: 500-505, 1993.
53. CASTÉS, M.; AGNELLI, A.; RONDÓN, AJ. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. Aug; 57(2):279-86, 1984.
54. CASTILHO, TM.; CAMARGO, LM.; MCMAHON-PRATT, D.; SHAW, JJ.; FLOETER-WINTER, LM. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Trop Med Hyg*. 78: 122–132, 2008.
55. CASTELLANO, LR.; FILHO, DC.; ARGIRO, L.; DESSEIN, H.; PRATA, A.; DESSEIN, A.; RODRIGUES, V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol*. Jun;70(6):383-90, 2009.
56. CARVALHO, AK.; SILVEIRA, FT.; PASSERO, LF.; GOMES, CM.; CORBETT CE, LAURENTI MD. *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite Immunol*. Aug-Sep;34(8-9):395-403, 2012.
57. CARVALHO, EM.; BARRAL, A.; COSTA, JM.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. Apr;56(4):315-25, 1994.
58. CARVALHO, EM.; BACELLAR, O.; BARRAL, A.; BADARO, R.; JOHNSON, WD, JR. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest*. Mar; 83(3):860-4, 1989.
59. CARVALHO, EM.; JOHNSON, WD.; BARRETO, E.; MARSDEN, PD.; COSTA, JL. et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol*. 135: 4144–4148, 1985.
60. CARVALHO, LP.; PASSOS, S.; BACELLAR, O.; LESSA, M.; ALMEIDA, RP.; MAGALHÃES, A.; DUTRA, WO.; GOLLOB, KJ.; MACHADO, P.; DE, JESUS, AR. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol*. May; 29(5):251-8, 2007.

61. CARVALHO, LP.; PASSOS, S.; SCHRIEFER, A.; CARVALHO, EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol.* 3:301, 2012.
62. CHARMOY, M.; AUDERSET, F.; ALLENBACH, C.; TACCHINI-COTTIER, F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol.* 719361, 2010.
63. COSTA, CA.; AFONSO, LC.; TOLEDO VP, GUIMARAES TM, NASCIMENTO E, TAVARES CA, MAYRINK W. Immune responses and protection induced in mice by an industrialized vaccine against American cutaneous leishmaniasis. *Parasitologia.* 1992 Dec;34(1-3):45-51.
64. COSTA, JM.; MARSDEN, PD.; LLANOS-CUENTAS, EA.; NETTO, EM.; CARVALHO, EM.; BARRAL, A.; ROSA, AC.; CUBA, CC.; MAGALHÃES, AV.; BARRETO, A. C. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg.* 89:319-323, 1986.
65. COUTINHO, SG.; OLIVEIRA, MP.; DA-CRUZ, AM.; DE, LUCA, PM.; MENDONÇA, SC.; BERTHO, AL.; SOONG, L.; MCMAHON-PRATT, D. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol.* Nov; 84(2):144-55, 1996.
66. CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNANDEZ, CT.; TAPIA, FJ.; CACERES-DITTMAR, G.; CASTES, M.; RONDON, AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 87: 444-448, 1993.
67. CONVIT, J.; ULRICH, M.; ZERPA, O.; BORGES, R.; ARANZAZU, N.; VALERA, M.; VILLARROEL, H.; ZAPATA, Z.; TOMEDES, I. Immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis in Venezuela, 1990 to 1999. *Trans R Soc Trop Med. Hyg* 97: 469-472, 2003.
68. CRUZ, I.; NIETO, J.; MORENO, J.; CANAVATE, C.; DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Rev.* 123(3):357-388, 2006.
69. CHU, N.; THOMAS, BN.; PATEL, SR.; BUXBAUM, LU. IgG1 is pathogenic in *Leishmania mexicana* infection. *J Immunol.* 185: 6939–6946, 2010.
70. CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; JR.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* Mar;50(3):296-311, 1994.
71. CUPOLILLO, E.; PEREIRA, LO.; FERNANDES, O.; CATANHO, MP.; PEREIRA, JC.; MEDINA-ACOSTA, E.; GRIMALDI, G. JR. Genetic data showing evolutionary links between *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Sep-Oct;93(5):677-83, 1998.
72. DA-CRUZ, AM.; BERTHO, AL.; OLIVEIRA-NETO, MP.; COUTINHO, SG. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Brazilian Journal of Dermatology,* 153: 537-543, 2005.

73. DA-CRUZ, AM.; BITTAR, R.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, MP.; NOGUEIRA, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; AZEREDO-COUTINHO, RB.; COUTINHO, SG. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* Mar;9(2):251-6, 2002.
74. DE, CASTRO.; EA, LUZ, E.; TELLES, FQ.; PANDEY, A.; BISETO, A.; DINAISKI, M.; SBALQUEIRO, I.; SOCCOL, VT. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. *Acta Trop.* Feb;93(2):141-9, 2005.
75. DESJEUX, P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* Nov;190(1-2):77-9, 2001.
76. DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol.* Oct;97 Suppl 1:3-15, 2003.
77. DESJEUX, P. Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol.* Sep;2(9):692, 2004.
78. DÍAZ, NL.; ARVELÁEZ, FA.; ZERPA, O.; TAPIA, FJ. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* Jan;31(1):114-7, 2006.
79. DILLON, RJ.; LANE, RP. Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Med Vet Entomol.* Jul;7(3):225-32, 1993.
80. DIVEU, C.; MCGEACHY, MJ.; CUA, DJ. Cytokines that regulate autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* Dec;20(6):663-8, 2008.
81. D'OLIVEIRA A, JR., MACHADO P, BACELLAR O, CHENG LH, ALMEIDA RP, CARVALHO EM. Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35: 7-10, 2002.
82. ELLOSO, MM.; SCOTT, P. Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *J Immunol.* Jun 1;162(11):6708-15, 1999.
83. FAGUNDES-SILVA, GA.; VIEIRA-GONCALVES, R.; NEPOMUCENO, MP.; DE, SOUZA, MA.; FAVORETO, S. JR.; OLIVEIRA-NETO, MP.; DA-CRUZ, AM.; GOMES-SILVA, A. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol.* Oct;34(10):486-91, 2012.
84. FALCÃO, CS.; DE, MOURA, TR.; CLARÊNCIO, J.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A.; DE, OLIVEIRA, CI. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. *Int J Parasitol.* Jul;42(8):771-80, 2012.
85. FARIA, DR.; GOLLOB, KJ.; BARBOSA, J. JR.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, PR.; LESSA, H.; CARVALHO, LP.; ROMANO-SILVA, MA.; DE, JESUS, AR.;  
86. CARVALHO, EM.; DUTRA, WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun.* Dec;73(12):7853-9, 2005.

87. FARIA, DR.; SOUZA, PE.; DURÃES, FV.; CARVALHO, EM.; GOLLOB, KJ.; MACHADO, PR.; DUTRA, WO. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* Aug;31(8):432-9, 2009.
88. FIGUEIRA, L. DE, P.; ZANOTTI, M.; PINHEIRO, FG.; FRANCO, AM. Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop.* Sep-Oct;41(5):512-4, 2008.
89. FIORENTINO, DF.; BOND, MW.; MOSMANN, TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* Dec 1;170(6):2081-95, 1989.
90. FRANKE, ED.; WIGNALL, FS.; CRUZ, ME.; ROSALES, E.; TOVAR, AA.; LUCAS, CM. et al. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med.* 113:934-40, 1990.
91. GAUTAM, S.; KUMAR, R.; MAURYA, R.; NYLÉN, S.; ANSARI, N.; RAI, M.; SUNDAR, S.; SACKS, D. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* Oct 1; 204(7):1134-7, 2011.
92. GAZE, ST.; DUTRA, WO.; LESSA, M. et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol.* 63:70-78, 2006.
93. GHALIB, HW.; PIUVEZAM, MR.; SKEIKY, YA.; SIDDIG, M.; HASHIM, FA.; EL-HASSAN, AM.; RUSSO, DM.; REED, SG. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest.* Jul; 92(1):324-9, 1993.
94. GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, PT.; PEREIRA, JM.; RILEY, LW.; WILSON, ME. HO. JL.; DE, JESUS, AR.; CARVALHO, EM, ALMEIDA, RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis.* Feb 22; 7:7, 2007.
95. GIUDICE, A.; VENDRAME, C.; BEZERRA, C.; CARVALHO, LP.; DELAVECHIA, T.; CARVALHO, EM.; BACELLAR, O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis.* Mar 29; 12:75, 2012.
96. GOMES-SILVA, A.; BITTAR, RC.; NOGUEIRA, RS. et al. Can interferon- $\gamma$  and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol.* 149:440-444, 2007.
97. GONTIJO, B.; DE, CARVALHO, ML. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36: 71-80, 2003.
98. GONTIJO, CM.; PACHECO, RS.; OREFICE, F.; LASMAR, E.; SILVA, ES.; MELO, MN. Concurrent cutaneous, visceral and ocular leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a kidney transplant patient. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jul;97(5):751-3, 2002.

99. GONZALEZ-LOMBANA, C.; GIMBLET, C.; BACELLAR, O.; OLIVEIRA, WW.; PASSOS, S.; CARVALHO, LP.; GOLDSCHMIDT, M.; CARVALHO, EM.; SCOTT. P.IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog.* Mar;9(3):e1003243, 2013.
100. GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111, 927-930, 2002.
101. GOTO, H & LINDOSO, J.; A, L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8(4), 419–433, 2010.
102. GRIMALDI, JR., R. G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews, Washington*, v. 6, p. 230-250, 1993.
103. GRIMALDI, JR. G. The utility of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and other non-human primate models for preclinical testing of *Leishmania* candidate vaccines. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Nov;103(7):629-44, 2008.
104. GUERRA, JAO.; SOUZA, AS.; LIMA, AA.; DIAS, CMF.; GUERRA, MVF. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) – avaliação de dois anos de trabalhos com reservatórios em área periférica da Cidade de Manaus. *Rev Soc Bras Med Trop.* 34:220, 2001.
105. (a)GUERRA, JAO.; COELHO, LIRC.; PEREIRA, FR.; SIQUEIRA, AM.; RIBEIRO, RL.; MIRANDA, T. L. et al American Tegumentary Leishmaniasis and HIV-AIDS Association in a Tertiary Care Center in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85(3), pp. 524–527, 2011.
106. (b)GUERRA, JÁ.; PRESTES, SR.; SILVEIRA, H. et al. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 5: e 980, 2011.
107. GUERRA, JAO.; BARROS, MLB.; GUERRA, MVF.; TALHARI, S.; PAES, MG. Leishmaniose tegumentar no Município de Manaus – aspectos epidemiológicos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 31:172, 1998.
108. GUERRA, J. A. O. et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil, Manaus, Amazonas, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 23, p.19-27, 2006.
109. HAQUE, A.; BEST, SE.; UNOSSON, K.; AMANTE, FH.; DE, LABASTIDA, F.; ANSTEY, NM.; KARUPIAH, G.; SMYTH, MJ.; HEATH, WR.; ENGWERDA, CR. Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol.* Jun 1; 186(11):6148-56, 2011.
110. HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; SALAIZA-SUAZO, N.; CARRADA, G.; ESCOTO, S.; RUIZ-REMIGIO, A.; ROSENSTEIN, Y.; ZENTELLA, A.; BECKER, I. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis.* Nov 2;4(11):e871, 2010.
111. HIRSCH, HH.; KAUFMANN, G.; SENDI, P.; BATTEGAY, M. Immune reconstitution in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis.* 2004 Apr 15;38(8):1159-66, 2004.

112. HOWARD, MK.; GULL, K.; MILES, MA. Antibodies to tubulin in patients with parasitic infections. *Clin Exp Immunol*. Apr; 68(1):78-85, 1987.
113. HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, JL. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology*. 132 Suppl: S19-32, 2006.
114. IVES, A.; RONET, C.; PREVEL, F.; RUZZANTE, G.; FUERTES-MARRACO, SF.; SCHUTZ, F.; ZANGGER, H.; REVAZ-BRETON, M.; LYE, L-F.; HICKERSON, SM.; BEVERLEY, SM.; ACHA-ORBEA, H.; LAUNOIS, PFASEL. N.; MASINA, S. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*. 331: 775-778, 2011.
115. JAYAKUMAR, A.; CASTILHO, TM.; PARQUE, E.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; BLACKWELL, JM.; MCMAHON-PRATT, D. TLR1 / 2 ativação durante o prime-boost heterólogo vacinação (DNA-MVA) melhora a resposta das células T CD8 + T de protecção contra *Leishmania* (*Viannia*). *PLoS negl Trop Dis* . Jun; 5 (6): E1204, 2011.
116. JANEWAY, CA.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216, 2002.
117. JANKOVIC, D.; TRINCHIERI, G. IL-10 or not IL-10: that is the question. *Nat Immunol*. Dec;8(12):1281-3, 2007.
118. JORDAN, KA.; HUNTER, CA. Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. *Exp Parasitol*. Nov; 126(3):318-25, 2010.
119. JUNQUEIRA, PEDRAS, M.; ORSINI, M.; CASTRO, M.; PASSOS, VM.; RABELLO, A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Nov; 47(3):477-85, 2003.
120. KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect*. Nov; 2(14):1765-73, 2000.
121. KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. Jul 11; 9(8):604-15, 2011.
122. KEMP, M.; THEANDER, TG.; KHARAZMI, A. The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. *Immunol Today*. Jan;17(1):13-6, 1996.
123. KELLY, BL.; STETSON, DB.; LOCKSLEY, RM. *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. *J Exp Med*. Dec 1;198(11):1689-98., 2003.
124. KIMA, PE.; CONSTANT, SL.; HANNUM, L.; COLMENARES, M.; LEE, KS.; HABERMAN, AM.; SHLOMCHIK, MJ.; MCMAHON-PRATT, D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. Mar 20; 191(6):1063-8, 2000.
125. KIMA, PE.; CONSTANT, SL.; HANNUM, L.; COLMENARES, M.; LEE, KS. et al. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required

- to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 191: 1063–1068, 2000.
126. KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, JA. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Ann Parasitol Hum Comp.* 66 Suppl 1: 71-4, 1991.
127. KORN, T.; BETTELLI, E.; GAO, W.; AWASTHI, A.; JAGER, A. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 448: 484–487, 2007.
128. KURASAWA, K.; HIROSE, K.; SANO, H.; ENDO, H.; SHINKAI, H.; NAWATA, Y.; TAKABAYASHI, K.; IWAMOTO, I. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* Nov; 43(11):2455-63, 2000.
129. LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jul-Sep; 82(3):421-4, 1987.
130. LAINSON, R.; SHAW, JJ.; SILVEIRA, FT.; BRAGA, RR.; ISHIKAWA, EA. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. *Ann Parasitol Hum Comp.* 65(5-6):282-4, 1990.
131. LANGRISH, CL.; CHEN, Y.; BLUMENSCHNEIN, WM.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, JD.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, RA.; CUA, DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* Jan 17;201(2):233-40, 2005.
132. LAOUAR, Y.; SUTTERWALA, FS.; GORELIK, L.; FLAVELL, RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol.* Jun;6(6):600-7, 2005.
133. LASKAY, T. VAN.; ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* May; 11(5):210-4, 2003.
134. LASKAY, T. VAN.; ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology.* 213(3-4):183-91, 2008.
135. LEOPOLDO, PT.; MACHADO, PR.; ALMEIDA, RP.; SCHRIEFER, A.; GIUDICE, A.; DE, JESUS, AR.; HO, JL.; GUIMARÃES, LH.; BACELLAR, O.; CARVALHO, EM. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis.* Apr 25; 6:75, 2006.
136. LESSA, HÁ.; MACHADO, P.; LIMA, F.; CRUZ, AA.; BACELLAR, O.; GUERREIRO, J. et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg.* 65:87-9, 2001.
137. LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology.* 213(3-4):377-87, 2008.
138. LIMA, EB.; PORTO, C.; MOTTA, JCO.; SAMPAIO, RNR. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana/ Treatment of American cutaneous leishmaniasis. *An Bras Dermatol.* 82: 111-24, 2007.

139. LINDOSO, JA.; BARBOSA, RN.; POSADA-VERGARA, MP.; DUARTE, MI.; OYAFUSO, LK.; AMATO, VS.; GOTO, H. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol*. Feb; 160(2):311-8, 2009.
140. LINDOSO, JA.; LINDOSO, AA. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop*. Sao Paulo. Sep-Oct; 51(5):247-53, 2009.
141. LOUZIR, H.; MELBY, PC. BEN.; SALAH, A.; MARRAKCHI, H.; AOUN, K.; BEN, ISMAIL. R.; DELLAGI, K. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Dis*. Jun;177(6):1687-95, 1998.
142. MACHADO, P.; KANITAKIS, J.; ALMEIDA, R.; CHALON, A.; ARAÚJO, C.; CARVALHO, EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol*. Sep-Oct; 12(5):449-51, 2002.
143. MACHADO, PRL.; CARVALHO, L.; ARAÚJO, MIAS.; CARVALHO, EM. Immune response mechanisms to infections. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, 79(6):647-664, nov/dez. 2004.
144. MACHADO, PR.; LESSA, H.; LESSA, M.; GUIMARÃES, LH. BANG, H.; HO, JL.; CARVALHO, EM. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 44: 788-93, 2007.
145. MACHADO, PR.; AMPUERO, J.; GUIMARÃES, LH.; VILLASBOAS, L.; ROCHA, AT.; SCHRIEFER, A.; SOUSA, RS.; TALHARI, A.; PENNA, G.; CARVALHO, EM. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 21; 4(12):e912, 2010.
146. MATOS, DS.; AZEREDO-COUTINHO, RB.; SCHUBACH, A.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; BAPTISTA, C.; MOREIRA, JS.; MENDONÇA, SC. Differential interferon- gamma production characterizes the cytokine responses to *Leishmania* and *Mycobacterium leprae* antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy. *Clin Infect Dis*. Jan 15; 40(2):e5-12, 2005.
147. MARSDEN, PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 80(6):859-76, 1986.
148. MARTINEZ, FO.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 27, 451-483, 2009.
149. MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and for their control. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 10, Supl. 2, p. 359-375, 1994.
150. MARZOUKI, S.; ABDELADHIM, M.; ABDESSALEM, CB.; OLIVEIRA, F.; FERJANI, B.; GILMORE, D.; LOUZIR, H.; VALENZUELA, JG.; BEN, AHMED, M. Salivary antigen SP32 is the immunodominant target of the antibody response to *Phlebotomus papatasi* bites in humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(11):e1911, 2012.
151. MATTA, NE.; NOGUEIRA, RS.; FRANCO, AMR.; SOUZA, SI.; MATTOS, MS.; OLIVEIRA-NETO, MP.; COUTINHO, SG.; LEON, LL.; CRUZ, AM. *Leishmania* (Viannia)

guyanensis Induces Low Immunologic Responsiveness in Leishmaniasis Patients from an endemic area of the Brazilian Amazon highland. *Am. J. Trop Med Hyg.* 80(3), pp 339-344, 2009.

152. MATTNER, J.; WANDERSEE-STEINHÄUSER, A.; PAHL, A.; RÖLLINGHOFF, M.; MAJEAU, GR.; HOCHMAN, PS.; BOGDAN, C. Protection against progressive leishmaniasis by IFN-beta. *J Immunol.* Jun 15;172(12):7574-82, 2004.

153. MAYRINK, W.; MAGALHÃES, PA.; MICHALICK, MSM.; DA, COSTA, CA.; OLIVEIRA, LIMA. A.; MELO, MN.; TOLEDO, VPCP.; NASCIMENTO, E.; DIAS, M.; GENARO, O.; HERMETO, MV.; WILLIAMS, P. Immunotherapy as a treatment of American cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. *Parasitologia.* 34: 159-165, 1992.

154. MCCONVILLE, MJ.; NADERER, T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol.* 65:543-61, 2011.

155. MCGEACHY, MJ.; BAK-JENSEN, KS.; CHEN, Y.; TATO, CM.; BLUMENSCHNEIN, W.; MCCLANAHAN, T.; CUA, DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* Dec;8(12):1390-7, 2007.

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

157. MIGUEL, DC.; ZAULI-NASCIMENTO, RC.; YOKOYAMA-YASUNAKA, JKU.; KATZ, S.; BARBIÉRI, CL.; ULIANA, SRB. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. *J Antimicrob Chemot.* 63: 365-368, 2009.

158. MIRANDA-VERÁSTEGUI, C.; LLANOS-CUENTAS, A.; ARÉVALO, I.; WARD, BJ.; MATLASHEWSKI, G. Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis.* 40: 1395-1403, 2005.

159. MOJTAHEDI, Z.; CLOS, J.; SARVESTANI-KAMALI, E. *Leishmania major*: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Experimental Parasitology.* 119: 422-429, 2008.

160. MOMENI, AZ.; REISZADAE, MR.; AMINJAVAHARI, M. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a combination of allopurinol and low-dose meglumine antimoniate. *Int J Dermatol.* Jul; 41(7):441-3, 2002.

161. MOSSER, DM.; BURKE, SK.; COUTAVAS, EE.; WEDGWOOD, JF.; EDELSON, PJ. *Leishmania* species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Exp Parasitol.* Dec; 62(3):394-404, 1986.

162. MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev.* Mar; 240(1):286-96, 2011.

163. MUNIZ-JUNQUEIRA, MI.; DE, PAULA-COELHO, VN. Meglumine antimoniate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via

TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *Int Immunopharmacol.* Dec 10;8(12):1633-8, 2008.

164. MUSA, A. M.; NOAZIN, S.; KHALIL, EAG. MODABBER, F. Immunological stimulation for the treatment of leishmaniasis: a modality worthy of serious consideration. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 104: 1-2, 2010.

165. MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 366: 1561-1577, 2005.

166. MURRAY, HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* Aug; 45(8):2185-97, 2001.

167. NAIFF, RD.; TALHARI, S.; BARRETT, TV. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 83: 529-530, 1988.

168. NAIFF, MF.; CUPOLILLO, E.; NAIFF, RD.; MOMEN, H.; BARRET, TV.; GRIMALDI, JR. G. Leishmaniose tegumentar americana na Amazônia: distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. *Rev Soc Bras Med Trop.* 32 Suppl 1:243, 1999.

169. NATEGHI, ROSTAMI. M.; KESHAVARZ, H.; EDALAT, R.; SARRAFNEJAD, A.; SHAHRESTANI, T.; MAHBOUDI, F.; KHAMESIPOUR, A. CD8+ T cells as a source of IFN- $\gamma$  production in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* Oct 12; 4(10):e845, 2010.

170. NEVES, DB.; CALDAS, ED.; SAMPAIO, RN. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis--relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. *Trop Med Int Health.* Dec; 14(12):1515-22, 2009.

171. NEVES, LO.; TALHARI, AC.; GADELHA, EPN.; SILVA, JÚNIOR. RM.; GUERRA, JAO.; FERREIRA, LCL.; TALHARI, S. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis* An Bras Dermatol. 86(6):1092-101, 2011.

172. NYLEN, S.; MASHO, K.; SODERSTROM, K. et al. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol.* 131:457-467, 2003.

173. NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* Sep; 28(9):378-84, 2007.

174. OLIVEIRA, MAP.; PIRES, AS.; BASTOS, RP.; LIMA. GMCA.; PINTO, AS.; PEREIRA, LIA.; PEREIRA, AJCS.; ABRAHAMSOHN, IA.; DORTA, ML.; RIBEIRO-DIAS, F. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 52: 83-8, 2010.

. 175. O'NEIL, CE.; LABRADA, M.; SARAVIA, NG. *Leishmania (Viannia) panamensis*-specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* Aug;49(2):181-8, 1993.

176. OLIVEIRA, F.; BAFICA, A.; ROSATO, AB.; FAVALI, CBF.; COSTA, JM.; CAFÉ, V.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-

stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 85: 70-73, 2011.

177. OUELLETTE, M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Trop Med Int Health.* Nov; 6(11):874-82, 2001.

176. OZBILGE, H.; AKSOY, N.; GUREL, MS.; YAZAR, S. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. *J Med Microbiol.* Oct; 55(Pt 10):1329-31, 2006.

178. PADIGEL, UM.; ALEXANDER, J.; FARRELL, JP. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol.* Oct 1; 71(7):3705-10, 2003.

179. PETERS, NC.; SACKS, DL. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.* Sep; 1(9):1290-6, 2009.

180. PETERS, NC. EGEN.; JG, SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, MP.; GERMAIN, RN.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* Aug 15; 321(5891):970-4, 2008.

181. PERINOTO, ÂC.; MAKI, RM.; COLHONE, MC.; SANTOS, FR.; MIGLIACCIO, V.; DAGHASTANLI, KR.; STABELI, RG.; CIANCAGLINI, P.; PAULOVICH, FV.; DE, OLIVEIRA, MC.; OLIVEIRA, ON. JR.; ZUCOLOTTO, V. Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: innovations in bioanalytics for a neglected disease. *Anal Chem.* Dec 1; 82(23):9763-8, 2010.

182. PIMENTEL, MI.; BAPTISTA, C.; RUBIN, EF.; VASCONCELLOS, EDE. C.; LYRA, MR.; SALGUEIRO, MDE. M.; SAHEKI, MN.; ROSALINO, CM.; MADEIRA, MDE. F.; SILVA, AF.; CONFORT, EM.; SCHUBACH, ADE, O. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop.* Mar-Apr; 44 (2):254-6, 2011.

183. PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MODLIN, RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* Apr; 91(4):1390-5, 1993.

184. PITTA, MG.; ROMANO, A.; CABANTOUS, S.; HENRI, S.; HAMMAD, A. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest.* 119: 2379–2387, 2009.

185. POMPEU, MM.; BRODSKYN, C.; TEIXEIRA, MJ.; CLARÊNÇIO, J. VAN.; WEYENBERG, J.; COELHO, IC.; CARDOSO, SA.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. *Infect Immun.* Dec;9(12):7453-60, 2001.

186. PRATES, D.; ARAÚJO-SANTOS, T.; LUZ, NF.; ANDRADE, BB.; FRANÇA-COSTA, J.; AFONSO, L.; CLARÊNÇIO, J.; MIRANDA, JC.; BOZZA, PT.; DOSREIS, GA.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BORGES, VM.; BARRAL, A. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. *J Leukoc Biol.* Sep; 90(3):575-82, 2011.

187. PRAJEETH, CK.; HAEBERLEIN, S.; SEBALD, H.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. *Infect Immun.* Jul; 79 (7):2699-708, 2011.
188. PIMENTEL, MI.; BAPTISTA, C.; RUBIN, EF.; VASCONCELLOS, EDE. C.; LYRA, MR.; SALGUEIRO, MDE. M.; SAHEKI, MN.; ROSALINO, CM.; MADEIRA, MDE. F.; SILVA, AF.; CONFORT, EM. SCHUBACH, ADE, O. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop.* Mar-Apr; 44(2):254-6, 2011.
189. POINAR, GJ. Early Cretaceous trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae in Burmese amber. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102: 635-7, 2007.
190. POSADA-VERGARA, MP.; LINDOSO, JAL.; TOLEZANO, JE.; PEREIRA-CHIOCCOLA, VLP.; SILVA, MV.; GOTO, H. Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome in 2 patients with AIDS. *J Infect Dis.* 192: 1819–1822, 2005.
191. RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol.* Oct; 97 Suppl 1:17-28, 2003.
192. RAMALHO-ORTIGAO, M.; JOCHIM, RC.; ANDERSON, JM. et al. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania major*-infected sandflies. *BMC Genomics.* 8: 300, 2007.
193. RAMALHO-ORTIGAO, M.; SARAIVA, EM. and Traub-Csekö YM. Sand Fly-*Leishmania* Interactions: Long Relationships are Not Necessarily Easy. *The Open Parasitology Journal.* 4, 195-204, 2010.
194. RANGEL, EF.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Nov;104(7):937-54, 2009.
195. REIS, AB.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, AM.; MARQUES, MJ.; GIUNCHETTI, RC.; MAYRINK, W.; GUERRA, LL.; ANDRADE, RA.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, OA. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* Aug 15;112(3-4):102-16, 2006.
196. REIS, LC.; BRITO, MEF.; SOUZA, MA.; MEDEIROS, ACR.; SILVA, CJ.; LUNA, CF.; PEREIRA, VRA. Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. *J Clin Lab Anal.* 23: 63-69, 2009.
197. REITHINGER, R.; DUJARDIN, JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J. Clin. Microbiol.* 45: 21–25, 2007.
198. REIS, L. Caracterização da resposta imune celular em portadores de leishmaniose tegumentar americana antes e após tratamento quimioterápico. Recife. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) — Centro de Pesquisas Aggeu, Magalhães, *Fundação Oswaldo Cruz*, 126 p.: il, 2007.

199. READY, PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol.* 6:227–250, 2013.
200. RIBEIRO, JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol.* 32:463-78, 1987.
201. RIBEIRO-GOMES, FL.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2:59, 2012.
202. RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, RP.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 31: 143-148, 1998.
203. RILEY, R.S., MAHIN, E.J. - Clinical applications of flow cytometry. *ASCP National Meeting.* Las Vegas, Nevada, 1988.
204. RITTIG, MG.; BOGDAN, C. *Leishmania* – Host-Cell interaction: Complexities and alternative views. *Parasitol Today.* 16, 292-297, 2000.
205. ROMERO, GA. Predicting relapse after treatment for American cutaneous leishmaniasis. *Bull World Health Organ.* 79 (12):1169, 2001.
206. ROMERO GA, DE LA GLORIA ORGE M, DE FARIAS GUERRA MV, PAES MG, DE OLIVEIRA MACEDO V, DE CARVALHO EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop* 93: 49-56, 2005.
207. ROGERS, M.; KROPF, P.; CHOI, BS.; DILLON, R.; PODINOVSKAIA, M.; BATES, P.; MÜLLER, I. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog.* Aug; 5(8), 2009.
208. ROCHA, RP.; FERNANDES, GJ.; VENGJER, A.; MONGON, ML.; RIBEIRO, FP.; LONGUINHO E SILVA, RB. Distribution of the lateral cutaneous nerve of the thigh in the area of intramuscular injection. *Rev Assoc Med Bras.* Oct-Dec; 48(4):353-6, 2002.
209. ROCHA, RD.; GONTIJO, CM.; ELÓI-SANTOS, SM.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; FERRARI, TC.; MARQUES, MJ.; MAYRINK, W.; MARTINS-FILHO, OA. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* Feb; 11(2):156-66, 2006.
210. RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, JJ.; BRAGA, RR.; ISHIKAWA, EA. Leishmaniasis in Brazil. XXV. Sandfly vectors of *Leishmania* in Pará State, Brazil. *Med Vet Entomol.* Oct;1(4):383-95, 1987.
211. RUIZ, JH.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Par Immunol.* 29:671–678, 2007.
212. SASSI, A.; LOUZIR, H.; BEN, SALAH, A.; MOKNI, M. BEN.; OSMAN, A.; DELLAGI, K. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production

after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clin. Exp. Immunol.* 116: 127–132, 1999.

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

214. SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 55:453-83, 2001.

215. SALHI, A.; RODRIGUES, V.; JR, SANTORO, F.; DESSEIN, H.; ROMANO A, CASTELLANO LR, SERTORIO M, RAFATI S, CHEVILLARD C, PRATA A, ALCAÏS A, ARGIRO L, DESSEIN A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol.* 2008; 180:6139–6148.

216. SAMPAIO, R. N. SALARO, CP. Resende P, de Paula CD. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV/AIDS: report of four clinical cases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 35, n. 6, p. 651-654, 2002.

217. SANTOS, CDA. S.; BOAVENTURA, V.; RIBEIRO, CARDOSO. C.; TAVARES, N.; LORDELO, MJ.; NORONHA, A.; COSTA, J.; BORGES, VM.; OLIVEIRA, DE, CI. VAN, WEYENBERGH, J.; BARRAL, A.; BARRAL –NETTO, M.; SILVA, D. Leishmaniose tegumentar queloidiana com lesões ósseas. *An Bras Derm Sif* 33: 3-7, 1958.

218. SANTOS, LO.; VITÓRIO, BS.; BRANQUINHA, MH.; PEDROSO, E.; SILVA, CM.; SANTOS, AL.; D'AVILA-LEVY, CM. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother.* Feb; 68(2):348-53, 2013.

219. SCHLEIN, Y.; JACOBSON, RL.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 9944-8, 1992.

220. SCHRIEFER, A.; WILSON, ME.; CARVALHO, EM. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* Oct; 21(5):483-8, 2008.

221. SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, AV.; SARTORI, A.; OLIVEIRA-NETO, MP.; MATTOS, MS.; ARAUJO, ML.; SOUZA, WJS.; HADDAD, F.; PEREZ, MA.; PACHECO, RS.; MOMEN, H.; COUTINHO, SG.; MARZOCHI, MCA.; MARZOCHI, KBF.; COSTA, SCG. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 987–996, 2001.

222. SCOTT, P. *Leishmania* – a parasitized parasite. *N Engl J Med.* 364(18): 773-774, 2011.

223. SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* Nov 1; 147(9):3149-55, 1991.

224. SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, RLT.; PEARCE, E.; SHER, A. Immuno regulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal of Experimental Medicine*, 168:1675-84, 1988.

225. SCOTT, P.; PEARCE, E.; CHEEVER, AW.; COFFMAN, RL.; SHER, A. Role of cytokines and CD4+T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunology Review*, 112:161-82, 1989.
226. SHAW, J. The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Aug;102(5):541-7, 2007.
227. SIMPSON, L.; NECKELMANN, N.; DE, LA.; CRUZ, VF.; SIMPSON, AM.; FEAGIN, JE.; JASMER, DP.; STUART, K. Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *J Biol Chem*. May 5; 262(13):6182-96, 1987.
228. SINHA, S.; FERNANDEZ, G.; KAPILA, R.; LAMBERT, WC & SCHARTZ, RA. Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *International Journal of Dermatology* 47: 1263–1270, 2008.
229. SINAN/SVS/MS. Boletim eletrônico epidemiológico, abril, 2012.
230. SILVEIRA, FT.; SHAW, JJ.; BRAGA, RR.; ISHIKAWA, E. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp. a new parasite from the State of Pará. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Apr-Jun;82(2):289-91, 1987.
231. SILVA, AV.; PAULA, AA.; CABRERA, MA.; CARREIRA, JC. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. *Cad Saude Publica*. Jan-Feb;21(1):324-8, 2005.
232. SILVEIRA, FT, LAINSON R, SHAW JJ, DE SOUZA AA, ISHIKAWA EA, BRAGA RR. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Nov-Dec;85(6):735-8, 1991.
233. SILVEIRA, FT.; LAINSON, R.; CORBETT, CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99: 239-251, 2004.
234. SILVEIRA, FT.; LAINSON, R.; CASTRO, GOMES. CM.; LAURENTI, MD.; CORBETT, CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 423-431, 2009.
235. SOARES, G.; BARRAL, A.; COSTA, JM.; BARRAL-NETTO, M. VAN.; WEYENBERGH, J. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol* 79: 36-9, 2006.
236. SOARES, RP.; TURCO, SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc*. Sep; 75(3):301-30, 2003.
237. Sojka DK , Huang YH , Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008 May; 124(1):13-22.
238. SOTO, J.; ARANA, BA.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEJA, JC.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, JD.; JUNGE, K.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 38: 1266-1272, 2004.

239. SOUMELIS, V.; VOLPE, E. TH17 differentiation, a complex process in mouse and man. *Med Sci (Paris)*. Nov; 24(11):925-7, 2008.
240. SOUSA, AQ.; POMPEU, MM.; SÓLON, FR.; FRUTUOSO, MS.; TEIXEIRA, MJ.; SILVA, TM. Disseminated cutaneous leishmaniasis: a patient with 749 lesions. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 10(3):230, 2006.
241. SOUZA, MA.; DA, SILVA, AG.; AFONSO-CARDOSO, SR.; FAVORETO, SJ.; FERREIRA, MS. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in American tegumentary leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. Mar-Apr; 38(2):137-41, 2005.
242. SOUZA, MA.; CASTRO, MC.; OLIVEIRA, AP.; ALMEIDA, AF.; REIS, LC, SILVA, CJ.; BRITO, ME.; PEREIRA, VR. American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. *Scand J Immunol*. Aug; 76(2):175-80, 2012.
243. SOTTO, MN.; YAMASHIRO-KANASHIRO, EH.; DA, MATTA.; VL.; DE, BRITO, T. Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. *Acta Trop*. 46: 121–130, 1989.
244. SUTTON, C.; BRERETON, C.; KEOGH, B.; MILLS, KH.; LAVELLE, EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 203: 1685–1691, 2006.
245. SNIDER, H.; LEZAMA-DAVILA, ALEXANDER. J.; SATOSKAR, AR. Sex Hormones and Modulation of Immunity against Leishmaniasis. *Neuroimmuno-modulation*. 16:106–113, 2009.
246. TALHARI, AC.; DIETZE, R.; TALHARI, CC.; DA, SILVA, RM.; GADELHA, YAMASHITA. EP.; DE, OLIVEIRA, PENNA. G.; LIMA, MACHADO, PR.; TALHARI, S. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 84:255–260, 2011.
247. TAPIA, FJ.; CACERES-DITTMAR, G.; SANCHEZ, MA.; FERNANDEZ, AE.; CONVIT, J. The cutaneous lesion in American leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. *Biol Res*. 26(1-2): 239-47, 1993.
248. TAVARES-NETO, J. et al. Caracterização sociodemográfica da população do povoado de Cavunge-Bahia / Sociodemographic characterization of the Cavungeis village (Bahia, Brazil) population. *Revista Baiana de Saúde Pública*, Salvador, v. 27, n. 1/2, p. 60-75, 2003.
249. TRACY, JW.; WEBSTER, JR. L,T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: amebiasis, trichomoniasis, trypanosomiasis, leishmaniasis, and other protozoal infections. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill. p 1097-113, 2001.
250. TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Nov; 51(2):229-42, 2007.
251. TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*, 7, 179-190, 2007.

252. TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr; 87 (7):2414-8, 1990.
253. TOLEDO, V. P. C. P., W. MAYRINK, K. J. GOLLOB, M. A. P. OLIVEIRA, C. A. COSTA, O. GENARO, J. A. PINTO, AND L. C. C. AFONSO. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96:89-98, 2001.
254. THOMAS, BN.; BUXBAUM, LU. Fc $\gamma$ RIII mediates immunoglobulin G-induced interleukin-10 and is required for chronic *Leishmania mexicana* lesions. *Infect Immun*. Feb; 76(2):623-31, 2008.
255. TRUJILLO, C.; RAMÍREZ, R.; VÉLEZ, ID.; BERBERICH, C. 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. *Immunol Lett*. Dec 1; 70(3):203-9, 1999.
256. TURETZ, ML.; MACHADO, PR.; KO, AI.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, RP.; MOBASHERY, N.; JOHNSON, WD. JR.; CARVALHO, EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. Dec 15;186(12):1829-34, 2002.
257. VALE, ECS.; FURTADO, T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. *An Bras Dermatol*. 80(4):421-8, 2005.
258. VAN, DER.; SNOEK, EM.; ROBINSON, DJ.; VAN, HELLEMOND, JJ.; NEUMANN, HAM. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *J Eur Ac Dermatol Venereol* 22: 918-922, 2008.
259. VAN, YH.; LEE, WH.; ORTIZ, S.; LEE, MH.; QIN, HJ. LIU, CP. All-trans retinoic acid inhibits type 1 diabetes by T regulatory (Treg)-dependent suppression of interferon-gamma-producing T-cells without affecting Th17 cells. *Diabetes*. Jan; 58(1):146-55, 2009.
260. VAN, ZANDBERGEN. G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*. Dec 1;173(11):6521-5, 2004.
261. VIANA, AG.; MAYRINK, W.; FRAGA, CA.; SILVA, LM.; DOMINGOS, PL.; BONAN, PR.; DE, PAULA, AM.; BOTELHO, AC. Histopathological and immunohistochemical aspects of American cutaneous leishmaniasis before and after different treatments. *An Bras Dermatol*. Jan-Feb; 88(1):32-40, 2013.
262. VIEIRA, MG.; OLIVEIRA, F.; ARRUDA, S.; BITTENCOURT, AL.; BARBOSA, AA. JR.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Oct; 97(7):979-83, 2002.
263. VIEIRA, ÉL.; KEESEN, TS.; MACHADO, PR.; GUIMARÃES, LH.; CARVALHO, EM.; DUTRA, WO.; GOLLOB, KJ Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunol*. Feb; 35(2):65-72, 2013.

264. WEIGLE, KA.; DE, DAVALOS, M.; HEREDIA, P.; MOLINEROS, R.; SARAVIA, NG.; D'ALESSANDRO, A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med. Hyg* 36: 489–496, 1987.
265. WERBOVETZ, K. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Curr Opin Inv Drugs*. 7:147-57, 2006.
266. WHO. Leishmaniasis: burden of disease. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en>>. Acesso em: 20\07\2013.
267. WHO. World Health Organization Technical Report Series no. 949: Control of the leishmaniasis. *Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis*, Geneva, 22–26 March 2010.
268. WILSON, ME.; JERONIMO, SM.; PEARSON, RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog*. Apr; 38(4):147-60, 2005.
269. WILSON, NJ.; BONIFACE, K.; CHAN, JR.; MCKENZIE, BS.; BLUMENSCHNEIN, WM.; MATTSON, JD.; BASHAM, B.; SMITH, K.; CHEN, T.; MOREL, F.; LECRON, JC.; KASTELEIN, RA.; CUA, DJ.; MCCLANAHAN, TK.; BOWMAN, EP.; DE, WAAL.; MALEFYT, R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. Sep;8 (9):950-7, 2007.

## **6. ANEXOS**

## ANEXO I

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PACIENTES COM LTA (ANEXO I)

A pesquisadora **Thaís Tibery Espir**, pede sua autorização para realizar exames em sua ferida nas atividades do Projeto de Pesquisa “**Estudo do perfil da resposta imunológica de pacientes infectados por *Leishmania* spp. e o emprego de marcadores imunológicos no diagnóstico da Leishmaniose cutânea no Amazonas**”. Serão realizados exames de laboratório a partir da ferida e do sangue para descobrir se tem a doença de **Leishmaniose Tegumentar conhecida como “Ferida brava”**. O sangue coletado por uma seringa de 5ml, não dói e nem prejudica a saúde. A coleta será realizada novamente daqui a 15 dias e após o tratamento. A vantagem de sua participação é apenas de caráter científico ao auxiliar este estudo que poderá proporcionar um exame menos agressivo no diagnóstico da **Leishmaniose** e através do sangue poderemos conhecer quais células estão envolvidas no processo de cura da infecção. Veja como é:



Depósito coletor do sangue



Estender o braço e prender com garrote



Coletar o sangue com seringa de 5ml



Colocar o sangue no tubo

Exames realizados na ferida: 1. Exame direto - retirar um pouco do líquido que está na ferida e colocar numa lamina e olhar no microscópio para procurar o “micróbio” da *Leishmania*



2. Cultivo - colocar em tubos com alimentos para fazer o “micróbio” crescer



3. Sorologia - tentar dosar a quantidade de “soldados de defesa” que o seu organismo está produzindo durante o período da doença.

A pesquisadora não dará nenhum benefício em dinheiro ou algo em troca e o sangue somente será utilizado para essa pesquisa. Se tiver alguém que não queira participar da pesquisa, os exames também serão realizados apenas para saber se está doente de **Leishmaniose** e **caso você queira se retirar do estudo em qualquer momento nada prejudicará seu tratamento para detecção e tratamento da doença**. Durante o estudo caso sinta-se mal, mesmo durante a noite, procure o membro clínico da equipe na Unidade de saúde Básica Manoel Romão no Km 135 da AM 010. Caso você queira saber mais detalhes, faça contato com o a pesquisadora pelo telefone (92) 3643-3065 ou pelo E-mail: [thaistibery@yahoo.com.br](mailto:thaistibery@yahoo.com.br). Os resultados serão divulgados nos meios científicos, sem os nomes ou características que possam identificar os pacientes que participaram da pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_ residente na comunidade \_\_\_\_\_ entendi e dou meu consentimento para realizarem os exames do projeto para descobrir o “parasita” da *Leishmania* na minha ferida ou sangue e atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

.....

Assinatura do paciente

...../...../.....

Data

-----

Assinatura do Pesquisador

## ANEXO II

Pesquisadora Responsável

Data

Ficha de investigação

Numero de registro \_\_\_\_\_

## Dados do paciente

1- Nome do paciente		
2- Data de nascimento __/__/____	3- Idade:	4- Sexo: <input type="checkbox"/> 1-Masculino 2- Feminino
5- Telefone:	6- Endereço completo:	

## Antecedentes epidemiológicos:

7- Data da investigação __/__/____	8- Ocupação/ ramo de atividade econômica:
---------------------------------------	---

9- Deslocamentos (datas e locais freqüentados no período de seis meses anterior ao início dos sinais e sintomas)

Data	Município

## Dados Clínicos

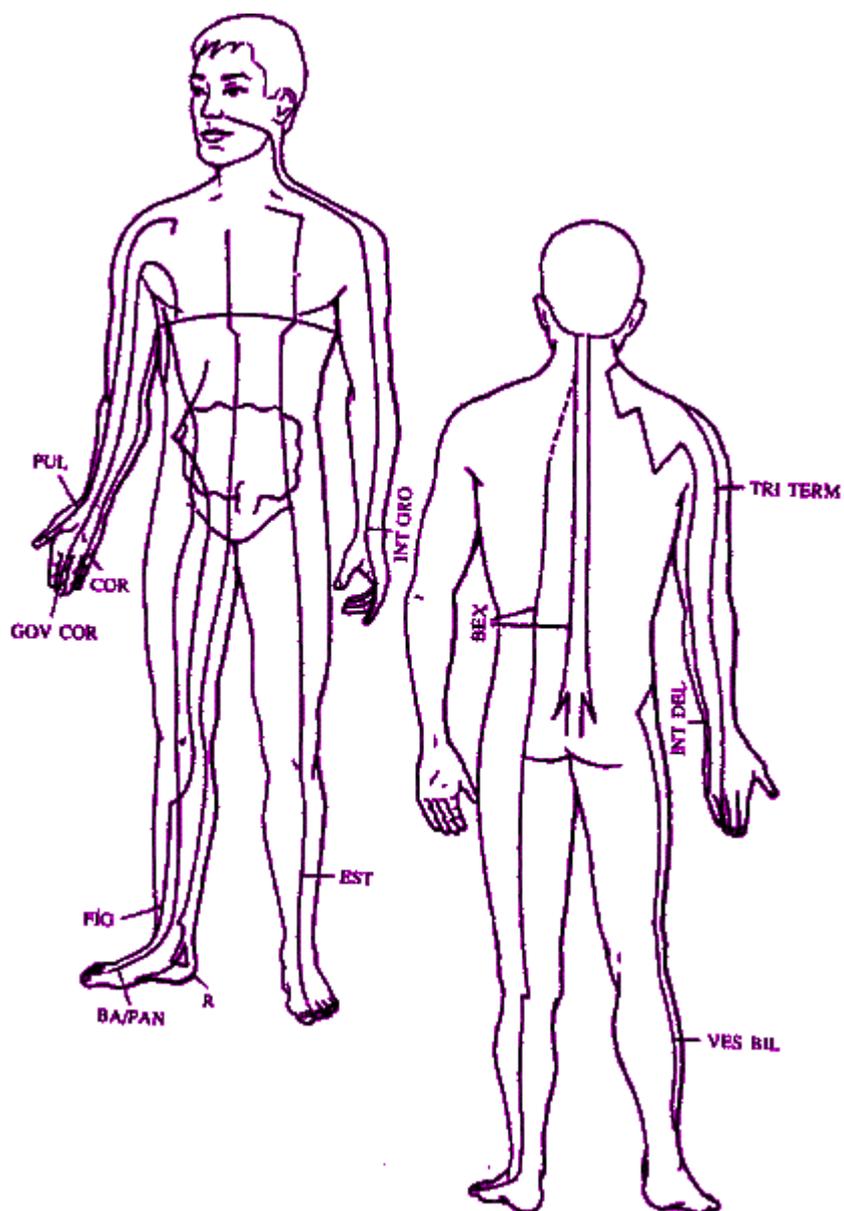
10- Presença de lesão: <input type="checkbox"/> 1- Cutânea 2- Mucosa 3- Cutânea difusa	11- Em caso de presença de lesão mucosa, há presença de cicatrizes cutâneas: <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não	
12- Parasitológico direto <input type="checkbox"/> 1- Positivo 2- Negativo 3- Não realizado	13- IDRM <input type="checkbox"/> 1- Positivo 2- Negativo 3- Não realizado	14- Tempo de evolução da lesão: _____
15- Número de lesões: _____	16- Características das lesões:	

Obs: Locais indicados no verso	
16- Outras infecções <input type="checkbox"/>	
1- Diabetes 2- Dermatológicas 3- DST 4- Parasitárias Especificar: _____	
17- Faz uso de algum medicamento? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2-Não	
Especificar _____	

### Tratamento

18- Data de início do tratamento: ____/____/____	19- Droga inicial utilizada: <input type="checkbox"/> 1- Antimonial pentavalente 2- Anfotericina b 3- Pentamidina 4- Outras
20- Peso: _____Kg	21- Dose prescrita em mg/kg/dia: _____
22- Outra droga utilizada na falência do tratamento inicial: <input type="checkbox"/> 1- Antimonial pentavalente 2- Anfotericina b 3- Pentamidina 4- Não se aplica	

Local das lesões:



### ANEXO III

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (ANEXO III)

A pesquisadora Thaís Tibery Espir pede autorização para coletar seu sangue que irá ajudar na realização das atividades do Projeto de Pesquisa **“Estudo do perfil da resposta imunológica de pacientes infectados por leishmania ssp. e o emprego de marcadores imunológicos no diagnóstico da Leishmaniose cutânea no Amazonas”** Se você autorizar esta coleta, seu sangue será utilizado como sangue de pessoa **sem a doença Leishmaniose** e servirá para compararmos com o sangue de outras pessoas que têm a doença. O que não for usado será guardado na coleção de soros do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas da Coordenação de Pesquisa em Ciências da Saúde. A coleta de 5 mL de sangue será realizada em uma veia de seu braço, podendo proporcionar uma leve dor no ato da coleta e uma pequena mancha roxa que desaparecerá em 3 a 4 dias após a coleta.

Mesmo após sua autorização, terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento fornecido pela pesquisadora. Você não terá nenhuma despesa e também nenhuma remuneração. Consequentemente a vantagem de sua participação é apenas de caráter científico ao auxiliar este estudo que poderá proporcionar um exame menos agressivo no diagnóstico da Leishmaniose.

Os resultados da pesquisa serão analisados e divulgados, porém sua identidade será mantida em sigilo para sempre. Se você quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa, faça contato com o(a) pesquisador(a) pelo telefone (92) 36433065 ou 88119108 ou pelo E-mail: thaistibery@yahoo.com.br.

#### Consentimento Após-Informação

Eu, \_\_\_\_\_, por me considerar

devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste documento e da pesquisa a ser desenvolvida, livremente dou meu consentimento para inclusão como participante da pesquisa e atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

\_\_\_\_\_ ou  \_\_\_\_\_  
 Assinatura do participante Data  
 Impressão do dedo polegar  
 Caso não saiba assinar

\_\_\_\_\_ - - - - -

## ANEXO IV

Concentrações séricas de citocinas (pg/mL) em sangue periférico nas amostras de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

ISOLADOS	IL-2 AT / PT	IL-4 AT/PT	IL-6 AT/PT	IL-10 AT/PT	IL-17 AT/PT	TNF AT/PT	INF- $\gamma$ AT/PT	IL-5 AT/PT	IL-8 AT/PT	IL-12 AT/PT
MHOM/BR/11/ IM 5875	218,79/ 220,22	210,21/ 218,79	271,70/ 253,11	87,23/ 111,54	144,43/144,43	157,30/ 174,46	77,22/ 92,95	11,50/14,90	4,58/5,99	1,502/838,0
MHOM/BR/11/IM 5869	234,52/ 218,79	204,49/ 185,90	193,05/191,62	101,53/102,96	155,87/ 131,56	147,29/161,59	87,23/ 70,07	5,91/9,80	7,07/7,75	1,519/1,295
MHOM/BR/11/ IM 5874	220,22/ 218,79	185,90/ 184,47	191,62/167,31	91,52/ 88,66	140,14/ 128,70	167,31/ 157,30	82,94/ 82,94	13,20/18,30	13,30/24,04	1,180/738,0
MHOM/BR/08/ IM 5515	225,94/ 237,38	187,33/ 211,64	234,52/ 195,91	98,67/ 70,07	150,15/ 138,71	153,01/ 161,59	77,22/ 77,22	9,47/13,80	6,18/7,24	1.205/782,0
MHOM/BR/09/ IM 5595	224,51/217,36	187,33/ 193,05	177,32/ 193,05	80,08/ 101,53	131,56/ 165,88	135,85/ 161,59	70,07/ 68,64	10,50/15,40	8,09/6,10	2,136/859,0
MHOM/BR/11/ IM 5772	214,50/220,22	205,92/ 198,77	173,03/ 268,84	134,42/132,99	132,99/ 134,42	167,31/ 163,02	82,94/ 94,38	7,51/14,20	8,42/8,09	1,347/844,0
MHOM/BR/10/IM 5653	224,51/ 221,65	164,45/ 208,78	201,63/ 208,78	101,53/ 110,11	121,55/ 143,00	151,58/ 155,87	80,08/ 72,93	9,60/15,20	8,25/7,77	1,256/716,0
MHOM/BR/10/IM5694	220,22/ 211,64	193,05/ 183,04	187,33/ 221,65	90,09/ 75,79	127,27/ 144,43	151,58/ 145,86	72,93/ 92,95	12,80/20,40	5,99/6,36	1,775/1,462
MHOM/BR/11/IM5747	223,08/208,78	190,19/185,90	364,65/ 150,15	101,53/ 90,09	214,50/ 115,83	158,73/ 141,57	118,69/ 60,06	9,82/15,40	6,72/3,85	1,256/876,0
MHOM/BR/11/IM5749	227,37/ 213,07	185,90/ 197,34	163,02/ 161,59	112,97/ 95,81	238,81/ 132,99	165,88/ 155,87	117,26/ 67,21	10,47/18,98	9,89/13,30	849,0/517,0
MHOM/BR/10/IM5692	205,92/ 197,34	193,05/ 177,32	213,07/ 194,48	94,38/ 90,09	128,70/ 115,83	151,58/ 148,72	100,10/ 85,80	6,23/11,80	10,50/7,32	1,276/659,0
MHOM/BR/10/IM5690	221,65/ 214,50	195,91/ 204,49	197,34/ 168,74	77,22/ 87,23	137,28/ 143,00	165,88/ 153,01	82,94/ 80,08	11,25/18,42	6,18/5,61	1,136/1,015
MHOM/BR/10/IM5637	225,94/ 215,93	181,61/ 170,17	197,34/ 185,90	101,53/ 101,53	245,96/ 140,14	153,01/ 145,86	77,22/ 70,07	15,60/21,40	8,65/8,42	895,0/654,0
MHOM/BR/11/IM5828	208,78/ 205,92	187,33/ 180,18	190,19/ 168,74	101,53/ 82,94	125,84/ 141,57	144,43/ 155,87	68,64/ 65,78	8,97/15,74	7,79/13,30	1,502/1,141
MHOM/BR/11/IM5773	211,64/ 214,50	187,33/ 188,76	203,06/ 247,39	95,81/ 97,24	121,55/ 114,40	145,86/ 143,00	85,80/ 84,37	21,90/28,95	25,80/13,30	1,212/889,0
MHOM/BR/11/IM5697	208,78/ 217,36	187,33/ 195,91	208,78/ 165,88	95,81/ 87,23	200,20/ 137,28	150,15/ 155,87	87,23/ 71,50	7,89/16,62	13,00/13,50	1,256/768,0
MHOM/BR/11/ IM 5976	205,92/217,36	175,89/184,47	191,62/ 234,52	82,94/ 92,95	132,99/ 178,75	150,15/ 140,14	64,35/ 82,94	8,98/15,40	7,65/5,22	1.595/1,550
Pvalor	p<0,0001	p<0,0001	p=0,0007	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p=0,6012*	p<0,0001

Legenda: AT-antes tratamento; PT: pós-tratamento com antimonial pentavalente, \* não apresentou resultado significativo.

## ANEXO V

Concentrações séricas de citocinas (pg/ml) em sangue periférico nas amostras de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana.

ISOLADOS	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17	TNF- $\alpha$	INF- $\gamma$
MHOM/BR/09/IM5553	240,24	171,60	171,60	81,51	117,26	183,04	72,93
MHOM/BR/09/IM5562	198,77	178,75	177,32	92,95	115,83	137,28	61,49
MHOM/BR/09/IM5584	183,04	175,89	150,15	78,65	118,69	148,72	58,63
MHOM/BR/10/IM5637	225,94	181,61	197,34	101,53	245,96	153,01	77,22
MHOM/BR/10/IM5641	215,93	188,76	193,05	82,94	124,41	161,59	74,36
MHOM/BR/10/IM5653	224,51	164,45	201,63	101,53	121,55	151,58	80,08
MHOM/BR/10/IM5657	208,78	193,05	205,92	94,38	358,93	144,43	75,79
MHOM/BR/10/IM5665	218,79	204,49	195,91	90,09	153,01	174,46	82,94
MHOM/BR/10/IM5684	205,92	180,18	194,48	81,51	286,00	134,42	65,78
MHOM/BR/10/IM5690	221,65	195,91	197,34	77,22	137,28	165,88	82,94
MHOM/BR/10/IM5692	205,92	193,05	213,07	94,38	128,70	151,58	100,10
MHOM/BR/10/IM5694	220,22	193,05	187,33	90,09	127,27	151,58	72,93
MHOM/BR/11/IM5697	208,78	187,33	208,78	95,81	200,20	150,15	87,23
MHOM/BR/11/IM5749	227,37	185,90	163,02	112,97	238,81	165,88	117,26
MHOM/BR/11/IM5772	203,06	180,18	155,87	137,28	124,41	141,57	74,36
MHOM/BR/11/IM5773	211,64	187,33	203,06	95,81	121,55	145,86	85,80
MHOM/BR/11/IM5775	227,37	185,90	163,02	112,97	238,81	165,88	117,26
MHOM/BR/11/IM5828	208,78	187,33	190,19	101,53	125,84	144,43	68,64
MHOM/BR/11/IM5833	237,48	221,65	214,50	128,70	117,26	221,75	80,08
MHOM/BR/11/IM5869	234,52	204,49	193,05	101,53	155,87	147,29	87,23
MHOM/BR/11/IM5875	218,79	210,21	271,70	87,23	144,43	157,30	77,22
MHOM/BR/11/IM5894	221,65	187,33	208,78	80,08	121,55	153,01	98,67
MHOM/BR/11/IM5950	194,48	177,32	213,07	82,94	118,69	141,57	67,21
MHOM/BR/11/IM5955	195,91	181,61	163,02	87,23	125,84	155,87	72,93
MHOM/BR/11/IM5962	208,78	178,75	181,61	81,51	153,01	128,70	77,22
MHOM/BR/11/IM5969	210,21	180,18	157,30	87,23	125,84	154,44	62,92
MHOM/BR/11/IM5976	205,92	175,89	191,62	82,94	132,99	150,15	64,35
MHOM/BR/11/IM5985	203,06	181,61	184,47	90,09	140,14	138,71	80,08
MHOM/BR/12/IM6006	203,06	178,75	155,87	84,37	127,27	157,30	84,37
MHOM/BR/12/IM6016	201,63	185,90	195,91	84,37	131,56	140,14	77,22
MHOM/BR/12/IM6025	201,63	170,17	164,45	87,23	117,26	154,44	74,36
MHOM/BR/12/IM6034	187,33	167,31	185,90	80,08	111,54	151,58	77,22
MHOM/BR/12/IM6038	201,63	170,17	181,61	78,65	138,71	147,29	68,64

Legenda: Isolados: M-mamífero; HOM- Homo sapiens; BR-país de origem (Brasil)/ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA.

## ANEXO VI



**PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE  
PESQUISAS COM SERES HUMANOS  
IDENTIFICAÇÃO DO PROTOCOLO**

Protocolo de Pesquisa nº:	006-10	Data de entrada:	24.03.10
Título do Projeto:	"Estudo do perfil da resposta imunológica de pacientes infectados por <i>Leishmania</i> spp. e o emprego de marcadores imunológicos no diagnóstico da Leishmaniose cutânea no Amazonas"		
Áreas do Conhecimento:	2. Ciências Biológicas		
Grupo Temático:	Grupo III		
Data de Início:	Jul-10	Data de Término:	Jul-13
		Valor Orçamento:	R\$ 23.630,56
Pesquisador Responsável:	Thaís Tibery Espir		
Financiamento:	Não:	Sim: <input checked="" type="checkbox"/>	Órgão: PPSUS – Edital 007/2009
Currículos no CNPq:	sim		
Currículos anexos ao Projeto:	não		
Instituição Responsável:	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA		
Resumo do Projeto:	<p>A Região Norte possui a maior incidência de leishmaniose do país, sendo a espécie <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> responsável pelo maior número de casos. Suas diferentes formas clínicas constituem um grave problema de saúde pública. As manifestações clínicas estão relacionadas às distintas espécies de <i>Leishmania</i> e à resposta imune do hospedeiro. A leishmaniose cutânea causada pela <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> e <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i> diferenciam-se das outras espécies nos aspectos da infecção clínica, diagnóstico e terapêutica. Devido ao caráter endêmico da leishmaniose no cenário mundial, é necessário progredir nos estudos dos agentes causadores e na adequada identificação e atuação da resposta imunológica envolvida no processo infeccioso. Este projeto se propõe a identificar as linhagens celulares envolvidas na resposta à infecção além da detecção e identificação das imunoglobulinas e citocinas expressas em soros de indivíduos infectados com <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> e <i>L. (V.) naiffi</i>, antes e após o tratamento com as drogas de escolha. Para isso, serão utilizadas as técnicas de citometria de fluxo e ELISA. Desta forma, este trabalho poderá trazer importantes avanços no desenvolvimento de drogas e vacinas mais efetivas para essa doença, endêmica nesta região do Brasil.</p>		
PALAVRAS CHAVE (máximo de 6):	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> , <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i> , Imunologia, Citometria de fluxo, soro, buff coat		

OBJETIVOS (CONFORME PROJETO DE PESQUISA)

Ricardo  
d'Amorim  
05/08/10

OBJETIVOS, METAS E INDICADORES QUANTITATIVOS PARA CADA META (acrescentar ou excluir linhas conforme necessidade).

OBJETIVOS	METAS	Indicador Quantitativo
1- Avaliar o perfil da Resposta Imunológica de pacientes infectados com <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> e <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i> (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)	Compreender a resposta imunológica na leishmaniose causada pelas duas espécies.	1080 ELISA 240 CITOMETRIA DE FLUXO
2- Identificar as células e populações de linfócitos (CD4, CD8, CD3, CD69, CD2, CD25, CD45RO) envolvidos na resposta imune humana contra as espécies <i>L.(V.) guyanensis</i> e <i>L.(V.) naiffi</i> antes, durante e após o tratamento;	Conhecer as células envolvidas na resposta imunológica antes, durante e após o tratamento da leishmaniose	Analisar os resultados obtidos no Citómetro
3- Detectar os níveis séricos e avidéz das diferentes classes de imunoglobulinas (IgM, IgG, IgA, IgE) e sub-classes de citocinas (TNF, IL-2, IL-10, IL-5, IL4, IL12, IL6, IL1 e IFN- $\gamma$ , M-CSF) em pacientes infectados com <i>L. (V.) guyanensis</i> e <i>L. (V.) naiffi</i> , antes, durante e após o tratamento;	Avaliar o padrão de produção de imunoglobulinas e citocinas produzidas antes, durante e após o tratamento da leishmaniose	1080 ensaios para detecção de Ig e citocinas em testes de Elisa
4- Averiguar a possibilidade de utilização de um dos métodos sorológicos como um marcador de infecção ativa para <i>L. (V.) guyanensis</i> e <i>L.(V.) naiffi</i> .	Conhecer o marcador de doença e cura da leishmaniose	Busca de prováveis marcadores de infecção
5- Padronizar o teste de Intra-dermoreação (Teste de Montenegro) nas infecções por leishmaniose	Relacionar o resultado do Teste de Montenegro utilizando o antígeno de referência do Ministério da Saúde com o padrão de resposta imunológica dos pacientes de leishmaniose	40 TESTES DE MONTENEGRO

**PARECER FINAL**

Após análise por pareceristas e membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do INPA, informo-lhe que seu protocolo teve a indicação de APROVAÇÃO.

Indicação: APROVAR
Comentários: O protocolo atende as exigências da Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares.

Informo-lhe que deverá apresentar ao CEP-INPA, ao final da pesquisa, cópia da dissertação prevista como produto do projeto, que servirá como relatório de conclusão da pesquisa. Assim, e conforme cronograma apresentado no protocolo, solicitamos que a mesma seja entregue até OUTUBRO/2013.

Data de liberação do Parecer: 24/06/10 na 59ª Reunião Ordinária do CEP-INPA.

Atenciosamente,

  
Dra. Suelly de Souza Costa  
Coordenadora do CEP-INPA  
PO nº 246/2009



## PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS COM SERES HUMANOS

### IDENTIFICAÇÃO DO PROTOCOLO

Protocolo de Pesquisa nº:	193/08	Data de entrada:	28/11/08
Título do Projeto:	Caracterização de proteínas diferencialmente expressas em plasma de pacientes infectados por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> antes e depois do tratamento e identificação de marcadores proteicos da infecção.		
Áreas do Conhecimento:	4. Ciências da Saúde		
Grupo Temático:	Grupo III		
Data de Início:	01/09	Data de Término:	07/2012   Valor Orçamento: R\$ 19.901,90
Pesquisador Responsável:	Luanda de Paula Figueira		
Financiamento:	Não: <input type="checkbox"/> x	Sim: <input type="checkbox"/>	Órgão: <input type="checkbox"/>
Currículos no CNPq:	todos		
Currículos anexos ao Projeto:	nenhum		
Instituição Responsável:	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA		
Resumo do Projeto:	<p>A Região Norte possui a maior taxa de incidência de Leishmaniose do país, sendo a espécie <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> responsável pelo maior número de casos da doença. A análise comparativa de mapas gerados por eletroforese bidimensional de plasmas de indivíduos normais e pacientes infectados com <i>L. (V.) guyanensis</i>, antes e pós-tratamento com antimonial pentavalente, irá possibilitar a identificação de proteínas diferencialmente acumuladas nessas condições. Este projeto se propõe a identificar marcadores proteicos da infecção pela detecção e identificação de proteínas e peptídeos diferencialmente expressos em plasmas de indivíduos não infectados, infectados e tratados para Leishmaniose. Para isso, será utilizada a tecnologia proteômica pela confecção e análise de géis bidimensionais utilizando-se a técnica DIGE ("Diferencial in-Gel Electrophoresis") e seqüenciamento de proteínas e peptídeos pela espectrometria de massa. A identificação de proteínas relacionadas à infecção através desta metodologia poderá trazer importantes avanços no desenvolvimento de drogas e vacinas mais efetivas para essa doença, endêmica nesta região do Brasil.</p>		

Objetivos (conforme Projeto de Pesquisa)

4. OBJETIVOS, METAS E INDICADORES QUANTITATIVOS PARA CADA META  
(acrescentar ou excluir linhas conforme necessidade).

OBJETIVOS	METAS	Indicador
-----------	-------	-----------

*Recibido 28/11/08 INPA*

		Quantitativo
1-Obter mapas proteômicos de plasmas de indivíduos normais de pacientes infectados com <i>Leishmania (V.) guyanensis</i> antes pós-tratamento;	Padronização de mapas proteômicos de plasma humano;	75 mapas 2D
2. Comparar os mapas protéicos obtidos por eletroforese 2D das diferentes fases e averiguar se existem diferenças quantitativas e qualitativas das proteínas expressas nas condições estipuladas;	Análise comparativa dos mapas proteômicos	Analisar em software próprio (platinum v. 7.0) os mapas obtidos
3- Caracterizar através de espectrometria de massa as proteínas diferencialmente expressas nos plasmas de pacientes infectados por <i>Leishmania (V.) guyanensis</i> ;	Seqüenciamento protéico	Seqüenciar em torno de 100 spots alvos para o estudo.
4- Comparar as proteínas/peptídeos específicas das diferentes fases, através da análise pelo método de coloração DIGE e identificar pela espectrometria de massa;	Análise de mapas protéicos utilizando a técnica do DIGE	Analisar as seqüências obtidas de em torno de 100 spots selecionados pelo método de DIGE
5- Identificar os possíveis candidatos a marcadores protéicos da infecção por <i>Leishmania. (V.) guyanensis</i> ;	Avaliação de seqüências e busca de prováveis marcadores de infecção	Sem indicador quantitativo
6- Detectar os níveis plasmáticos das diferentes imunoglobulinas (IgM, IgG, IgA, IgE) e citocinas (TNF, IL-10, IL-5 e IFN) em pacientes infectados com <i>L. (V.) guyanensis</i> .	Avaliação da resposta humoral	Serão realizados 200 ensaios para detecção de Ig e citocinas em testes de Elisa

### PARECER FINAL

Após análise por pareceristas e membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do INPA, informo-lhe que seu protocolo de pesquisa teve a indicação de **APROVAÇÃO**.



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

Ofício n. 062.13498.2012/DITEC-FAPEAM

Manaus, 31 de julho de 2012.

À Senhora,  
**Antônia Maria Ramos Franco Pereira**  
 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA  
 Av. André Araújo, nº 2936  
 CEP 69060-001 Manaus – AM

**Projeto:** Estudo do perfil da resposta imunológica de pacientes infectados por leishmania spp. E o emprego de marcadores imunológicos no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Amazonas

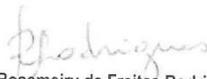
**Senhora Coordenadora,**

Em atenção ao acompanhamento das atividades do projeto supracitado, coordenado por V.Sa. no âmbito do Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde – PPSUS 2009 – Edital N. 007/2009, encaminhamos o parecer conclusivo emitido por consultores *Ad hocs*, referente a análise do Relatório Técnico Final apresentado por V.Sa. no Seminário de Avaliação Final do Programa PPSUS, realizado nos dias 10 e 11 de abril de 2013.

N	Consultor	Parecer	Tipo de Avaliação	Sugestões ao Coordenador do Projeto
1	3 e 7	APROVADO	FINAL	<b>Aprovado:</b> O projeto desenvolveu-se muito bem, com a boa produção científica, ainda que só um artigo tenha sido publicado até o momento. De acordo com os resultados alcançados, deve-se esperar que outros vier a ser produzidos. No cômputo geral projeto atingiu a todos os objetivos propostos inicialmente.

Por oportuno, agradecemos a sua participação e colocamo-nos a vossa disposição para outros esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

  
**Rosemeiry de Freitas Rodrigues**  
 Diretora Técnico-Científica, *em exercício*

Travessa dos Deuses, s/n - Flores  
 Tel.: (92) 3878-4000  
 gabinete@fapeam.com.gov.br  
 www.fapeam.com.gov.br  
 Manaus/AM - CEP: 69038-928

  
**FAPEAM**  
 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

  
**SECTI**  
 Secretaria do Estado de  
 Ciência, Tecnologia e Inovação

  
**AMAZONAS**  
 GOVERNO DO ESTADO  
 CRIANDO OPORTUNIDADES