



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Imunologia



Resposta imune a antígenos recombinantes de *Leishmania* e
imuno-modulação na leishmaniose tegumentar

TESE DE DOUTORADO

SARA TIMÓTEO PASSOS

Salvador - Bahia
2006



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Imunologia



Resposta imune a antígenos recombinantes de *Leishmania* e
imuno-modulação na leishmaniose tegumentar

Sara Timóteo Passos

Orientador: **Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho**

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de
Pós-Graduação em Imunologia Básica como
Pré-requisito para obtenção do título de Doutor

Salvador – Bahia
2006

Banca Examinadora

- 1) Prof^a Dr^a Hiro Goto – USP
- 2) Prof Dr. Carlos Brites – UFBA
- 3) Prof Dr. Lain Pontes de Carvalho – CPqGM / FIOcruz – Bahia
- 4) Prof Dr. Ajax Mercês Atta – UFBA
- 5) Prof Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho – UFBA - Orientador

Fontes Financiadoras

1. CAPES
2. NIH – grant AI-30639

Agradecimento Especial

A Lucas Carvalho, que desde os tempos de Faculdade me faz perceber o quanto cada dia em nossas vidas pode ser especial. Muito Obrigada.

*“Ainda que eu falasse a língua dos homens,
que eu falasse a língua dos anjos, sem amor
eu nada seria ...”*

Agradecimentos

A Deus por me conceder a chance de literalmente reviver e poder construir o meu futuro;

Ao Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho por sua orientação, exemplo e objetividade com que conduziu este trabalho;

A Dra. Olívia Bacellar por suas importantes sugestões e apoio nesta árdua tarefa;

A Lucas Carvalho que me ajudou sempre me incentivando e dedicou preciosos momentos na correção desta tese;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIIm) por seus ensinamentos que serviram de alicerce para esta tese;

Aos Colegas do Serviço de Imunologia que na convivência do dia-a-dia tanto me ensinaram;

A minha Família pelo amor e formação que me proporcionaram percorrer esse caminho;

A Elbe, Lúcia, Dilma, Cristiano e Orlando que sempre estão prontos a nos socorrer;

A Dilcéia por estar sempre nos dando suporte na Pós-Graduação;

A todos que colaboraram para que este trabalho pudesse ser realizado. Muito Obrigada.

Lista de Abreviaturas

B7	Moléculas co-estimulatórias presentes nas células apresentadoras de antígenos
CD28	Cluster of Diferenciation: Moléculas co-estimulatórias presentes nas células T
CD4	Marcador de Membrana Celular 4
CD40	Moléculas co-estimulatórias presentes nas células apresentadoras de antígenos
CD40L	Moléculas co-estimulatórias presentes nas células T
CD62	Marcador de Membrana Celular 62
CD69	Marcador de membrana Celular 69
CD8	Marcador de Membrana Celular 8
CD80	Marcador de Membrana Celular 80
CD86	Marcador de Membrana Celular 86
Células NK	Células Natural Killer
Células Th1	Células T “helper” (auxiliadoras) tipo 1
Células Th2	Células T “helper” (auxiliadoras) tipo 2
CHP	Complexo de Histocompatibilidade Principal
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4: Proteína citotóxica associada ao linfócito T CD4
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay: Ensaio Imuno-Enzimático
GM-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor: (Fator Estimulador de Colônias de Monócitos/Macrófagos e Granulócitos)

Gp46	Antígenos de Células T
Gp63	Antígenos de Células T
Gp72	Antígenos de Células T
Hsp-70	Heat Shock Proein: Antígenos de Células T
Hsp-83	Heat Shock Proein: Antígenos de Células T
HLA	Human Leucocitary Antigen: antígeno leucocitário humano
IFN- γ	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina do Tipo E
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-15R	Receptor de IL-15
IL-17	Interleucina 17
IL-2	Interleucina 2
IL-23	Interleucina 23
IL-27	Interleucina 27
IL-2R	Receptor de IL-2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilodaltons

KMP11	Proteína de superfície com peso molecular de 11 kDa
LACK	Receptor Homólogo de <i>Leishmania</i> para proteína C Kinase ativada
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LV	Leishmaniose Visceral
PPD	Derivado Protéico Purificado de <i>Mycobacterium bovis</i>
Proteína "Q"	Proteína Quimérica
rH2A	Antígeno Recombinante (histona) de <i>L. infantum</i>
rK39	Antígeno Recombinante Protéico de <i>L. chagasi</i>
SLA	Soluble Leishmania Antigen: Antígeno Solúvel de Leishmania
TNF- β	Fator de Necrose Tumoral beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
WSX-1	Receptor da citocina IL-27

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
Resumo	2
1. Aspectos Epidemiológicos e Clínicos das Leishmanioses	4
1.1 Aspectos Clínicos da Leishmaniose Visceral	6
1.1.1 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral	7
1.2 Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar	9
2. Aspectos Imunológicos das Leishmanioses	11
2.1 Aspectos Imunológicos na Leishmaniose Experimental	11
2.2 Aspectos Imunológicos na Leishmaniose Visceral Humana	13
2.3 Aspectos Imunológicos na Leishmaniose Tegumentar Humana	15
2.4 Resposta Imune a Antígenos Recombinantes de <i>Leishmania</i>	18
3. Objetivos	22
4. Relevância	23
5. Publicação 1	24
6. Publicação 2	26
7. Publicação 3	28
8. Discussão	30
9. Conclusões	42
10. Summary	43
11. Anexos	45
12. Referências Bibliográficas	53

Resumo

A leishmaniose de modo geral vem sendo amplamente estudada e diversas questões relacionadas aos aspectos imunológicos têm sido abordadas como caracterização e modulação da resposta imune. A linha de pesquisa abordada nesta tese visa caracterizar a resposta imune a antígenos recombinantes de *Leishmania* em pacientes com leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar e, avaliar aspectos relacionados à modulação da resposta imune na leishmaniose tegumentar.

No primeiro artigo, tendo em vista a dificuldade do diagnóstico precoce e correto da leishmaniose visceral, avaliamos a capacidade de três antígenos recombinantes (rH2A, KMP11 e Proteína “Q”) de *Leishmania* serem utilizados em teste sorológico e realizar o diagnóstico diferencial entre infecção sub-clínica por *L. chagasi* e doença. A sensibilidade e a especificidade do teste sorológico para diagnóstico da leishmaniose visceral foi de 100% para os três antígenos recombinantes estudados e em relação ao diagnóstico diferencial o KMP11 foi o antígeno que apresentou melhor capacidade de ser utilizado para distinguir entre a doença ativa e a infecção por *L. chagasi*.

Prosseguindo o estudo com antígenos recombinantes de *Leishmania*, no segundo artigo, mas visando avaliar aspectos relacionados à modulação da resposta imune em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, células mononucleares do sangue periférico destes pacientes foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* e adicionados os antígenos recombinantes LACK e KMP11 – antígenos indutores de IL-10. Os resultados encontrados mostraram que na leishmaniose cutânea, ambos os antígenos

foram capazes de suprimir a resposta de IFN- γ através da produção de IL-10, mas na leishmaniose mucosa essa supressão não foi observada, mesmo havendo produção de IL-10 pelos antígenos recombinantes.

Visando aprofundar o conhecimento da resposta imune em pacientes com leishmaniose cutânea e com leishmaniose mucosa, no terceiro artigo, avaliamos o papel de moléculas co-estimulatórias, marcadores de ativação de células T na modulação da resposta imune, além de determinar a capacidade de citocinas (IL-2, IL-12, IL-15) e de CTLA-4 em modular a produção de IFN- γ . Observamos que a intensidade da resposta Th1 na leishmaniose mucosa está associada com o aumento do número de células T efetoras ativadas. E que, a modulação não apropriada dessas células e a manutenção de uma resposta inflamatória persistente leva ao dano tecidual observado na leishmaniose mucosa.

Portanto, os resultados aqui apresentados contribuíram nas questões relacionadas aos aspectos imunológicos em grupos de pacientes com leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa no que se refere ao diagnóstico sorológico e modulação da resposta imune.

1. Aspectos Epidemiológicos e Clínicos das Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada por um protozoário intracelular obrigatório, do gênero *Leishmania*. Esta doença se apresenta sob um amplo espectro clínico e constitui-se um crescente problema de Saúde Pública, tendo cerca de 400 milhões de pessoas expostas à infecção, com uma incidência anual de 600.000 casos e uma prevalência de 12 milhões (WHO, 1998). A incidência anual da leishmaniose visceral varia entre diferentes regiões, com flutuações anuais e sazonais (Badaro, Jones, Lorenzo *et al.*, 1986). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose visceral acomete cerca de 500.000 pessoas a cada ano (WHO, 1998) e 1.5 milhão de pessoas / ano são acometidas pela leishmaniose tegumentar em todo o mundo (WHO, 2003).

As diversas formas clínicas observadas em nosso meio são a leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea clássica ou localizada, leishmaniose mucosa, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose cutânea disseminada. No Brasil, a forma clínica da leishmaniose mais comum é a leishmaniose cutânea (Grimaldi, Tesh *et al.*, 1989). A leishmaniose visceral clássica se caracteriza como uma forma grave e a leishmaniose visceral oligossintomática se caracteriza clinicamente por sintomatologia leve (mal estar e diarreia) (Badaro, Jones, Lorenzo *et al.*, 1986); a leishmaniose cutânea localizada se apresenta por lesão única ulcerada, com bordos indurados eritematosos, preferencialmente em membros inferiores (Llanos Cuentas, Cuba *et al.*, 1984); na leishmaniose mucosa a lesão não se limita à pele, atingindo também a mucosa, preferencialmente nas vias aéreas superiores, acometendo

especialmente o septo nasal (Llanos Cuentas, Cuba *et al.*, 1984); a forma difusa apresenta-se com lesões lepróides disseminadas e acometimento discreto de mucosas (Costa, Marsden *et al.*, 1986) e, finalmente a forma disseminada é caracterizada por múltiplas lesões papulares e acneiformes, sendo elevado o envolvimento de mucosas (Carvalho, Bacellar *et al.*, 1994).

No Brasil, nos últimos 20 anos, a incidência da leishmaniose aumentou consideravelmente com epidemias em vários estados nas regiões centro-oeste, sudeste, nordeste e amazônica (Gontijo e Carvalho EM, 2003). Na região nordeste são registrados cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral no Brasil, tendo o estado da Bahia uma média de 500 - 600 casos por ano, principalmente nas regiões semi-áridas (Badaro, Jones, Lorencó *et al.*, 1986). No Brasil a leishmaniose visceral é causada pela *L. chagasi* e, nos últimos 20 anos deixou de ser uma doença tipicamente rural e passou a ser documentada nos grandes centros urbanos como Natal (Jeronimo, Oliveira *et al.*, 1994), Teresina (Costa, Pereira *et al.*, 1990), e na localidade de Monte Gordo, um vilarejo próximo à Salvador (Cunha, Freire *et al.*, 1995).

No estado da Bahia, estudos epidemiológicos, clínicos e imunológicos têm sido realizados há mais de 20 anos, em uma área endêmica de leishmaniose tegumentar, Corte de Pedra, registrando as maiores taxas de incidência no estado, sendo 8.336 casos de leishmaniose cutânea e 348 casos de leishmaniose mucosa notificados no posto de saúde desta localidade entre os anos de 1987 e 2000. Todavia a real prevalência da doença no Brasil é difícil de ser estabelecida, devido às sub-notificações e ausência de diagnóstico. No entanto, o aumento no número de registros vem aumentando e no ano 2000 o

coeficiente de detecção foi de 18,63/100.000 habitantes, segundo a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2000).

As diferentes espécies de *Leishmania* estão divididas geralmente nos grupos de agentes causadores da doença tegumentar (*L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* no Novo Mundo e *L. tropica* e *L. aeotípica* no Velho Mundo) e da doença visceral (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*) (Barral, Costa *et al.*, 1995); (WHO, 1990). No Novo Mundo a doença visceral é causada pela *Leishmania chagasi*, no Mediterrâneo o agente causal é a *Leishmania infantum* e na África e Ásia a doença é causada pela *Leishmania donovani* (WHO, 1990).

1.1 Manifestações Clínicas da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral, também denominada calazar, é uma doença que quando não tratada, na maioria das vezes, é fatal.

A leishmaniose visceral é uma doença grave, debilitante, tendo como aspectos clínicos febre prolongada, perda de peso, anemia, hepatoesplenomegalia e hipergamaglobulinemia. Os indivíduos infectados por *L. chagasi* podem permanecer assintomáticos, apresentando a forma sub-clínica da infecção ou evoluírem diretamente para a forma clássica da doença (Badaro, Jones, Carvalho *et al.*, 1986). Estudos prévios realizados em áreas de transmissão de *L. chagasi* no Brasil indicam que menos de 15% dos indivíduos infectados irão desenvolver a forma clássica da leishmaniose visceral (Evans, Teixeira *et al.*, 1992; D'Oliveira Junior, Costa *et al.*, 1997). A maioria dos indivíduos infectados pode permanecer completamente assintomática ou

apresentar uma forma oligossintomática da doença. Indivíduos com infecção oligossintomática podem desenvolver a doença polisintomática, progressiva, meses depois da soro conversão ou podem resolver a infecção após um ou dois anos sem tratamento (Badaro, Jones, Carvalho *et al.*, 1986). A forma assintomática ocorre na maioria dos indivíduos residentes em área endêmica, os quais apresentam resultados positivos no teste intradérmico a antígenos de *Leishmania* e/ou nos testes sorológicos para anticorpos anti-*Leishmania*, sem apresentar sinais clínicos de doença. A forma oligossintomática apresenta-se com sintomas moderados de febre, hepatomegalia e mal-estar associados ao teste sorológico positivo. Nestes casos, a investigação de parasito em aspirado de medula óssea é geralmente negativa. Os indivíduos com a forma sub-clínica e os pacientes oligossintomáticos podem evoluir para cura espontânea ou progredir para a doença (Badaro, Jones, Lorencó *et al.*, 1986).

1.1.1 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral

O teste de referência para diagnóstico da leishmaniose visceral é a demonstração do parasito em material obtido de biópsia da medula óssea ou de baço. Entretanto, esses métodos são invasivos, requerem hospitalização e podem ser associados a complicações. O exame parasitológico de aspirado de medula óssea tem baixa sensibilidade e embora a identificação do parasito no aspirado esplênico apresente uma melhor sensibilidade, existem fatores limitantes à realização do procedimento, que incluem tamanho do baço (esplenomegalia) por causa do risco de sangramento e ruptura, número reduzido de plaquetas (<20.000) devido ao risco de sangramento e distúrbio na coagulação.

Os testes sorológicos têm sido de grande importância para a avaliação diagnóstica de pacientes com suspeita de leishmaniose visceral. Para o controle das complicações da doença é essencial que o diagnóstico da leishmaniose visceral seja precoce, sendo alguns testes sorológicos como imunofluorescência indireta, ensaio imuno - enzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) e o teste de aglutinação direta (DAT) os mais utilizados no diagnóstico dos casos, onde a pesquisa do parasito não pode ser realizada, sendo os métodos sorológicos os mais empregados nos estudos epidemiológicos (Badaro, Jones, Carvalho *et al.*, 1986; Badaro, Jones, Lorencó *et al.*, 1986; Reed, 1996). O diagnóstico sorológico se baseia na detecção de anticorpos séricos específicos. Cada teste sorológico apresenta suas peculiaridades, revelando pontos positivos e negativos. O ELISA, o DAT e a imunofluorescência indireta demonstram altos títulos de anticorpos específicos para *Leishmania* na maioria dos pacientes. No entanto, o principal obstáculo da maioria, se não de todas as técnicas para imunodiagnóstico da leishmaniose, é a reação cruzada com *Trypanosoma cruzi*, o agente causal da doença de Chagas (Reed, Badaro *et al.*, 1987).

O teste de ELISA foi introduzido para o diagnóstico da leishmaniose visceral por Hommel e colaboradores em 1978 (Hommel, Peters *et al.*, 1978). Este grupo estudou soros caninos e humanos provenientes do sul da França que foram testados com um antígeno preparado de *Leishmania infantum*. Seus resultados demonstraram que a reação foi sensível (90%) e específica (87%) para a leishmaniose visceral humana (Hommel, Peters *et al.*, 1978).

Os testes sorológicos convencionais para detecção de anticorpos da classe IgG contra antígenos de *Leishmania* são considerados simples, rápidos e não invasivos. Testes sorológicos para diagnóstico da leishmaniose visceral em geral são altamente sensíveis (> 90%) (Senaldi, Xiao-Su *et al.*, 1996). No entanto, esses testes têm especificidade limitada. De um lado, resultados falso-positivos podem ser obtidos devido à reação cruzada com antígenos existentes com agentes causadores de outras doenças infecciosas endêmicas em regiões onde a leishmaniose visceral é documentada. Por outro lado, estes testes não têm a capacidade de distinguir a infecção da doença clínica. Modificações dos antígenos usados para o teste de aglutinação direta (Zijlstra, Daifalla *et al.*, 1998) e para a técnica de ELISA (Badaro, Benson *et al.*, 1996) têm sido reportadas como sendo bem sucedidas em eliminar os resultados falso-positivos. Variações na sensibilidade do ELISA de acordo com o tipo do antígeno têm sido reportadas. Adicionalmente, mesmo após o tratamento da leishmaniose visceral, os resultados dos testes sorológicos deste pacientes continuam apresentando altos níveis de anticorpos.

1.2 Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose tegumentar é constituída por manifestações clínicas diversas da doença, representadas pela leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa, leishmaniose disseminada e leishmaniose cutânea difusa. A leishmaniose cutânea é muito freqüente no Brasil (Grimaldi, Tesh *et al.*, 1989). A leishmaniose cutânea localizada é a forma predominante de apresentação da

doença, caracterizada na maioria dos casos por lesão única ulcerada, com bordas elevadas, indurada e eritematosa, situando-se principalmente em locais expostos do corpo. Em áreas de transmissão de *L. braziliensis* a doença ocorre principalmente em membros inferiores, mas também podem ser encontradas lesões ulceradas em tronco, membro superior ou face. Embora caracteristicamente a lesão seja única, em alguns casos, podem estar presentes duas ou mais lesões clinicamente ativas. Em algumas oportunidades podem ser documentadas mais de uma lesão e mais raramente a doença inicia com uma única lesão e aparecem lesões satélites posteriormente (Llanos Cuentas, Cuba *et al.*, 1984).

A leishmaniose cutânea disseminada distingue-se por apresentar lesões papulares e acneiformes, e elevado envolvimento de mucosas (Carvalho, Bacellar *et al.*, 1994). Inicialmente a doença foi associada a *L. amazonensis*, mas, nos últimos 10 anos na área endêmica de Corte de Pedra, os casos de leishmaniose disseminada têm sido relacionados com a *L. braziliensis* (Turetz, Machado *et al.*, 2002). A leishmaniose disseminada apresenta aspectos clínicos, imunológicos e imunopatológicos distintos tanto da leishmaniose cutânea localizada como da leishmaniose cutânea difusa. A doença é observada principalmente em adultos e se caracteriza pela presença de lesões acneiformes que evoluem para formas ulceradas. Por outro lado, cerca de 40% dos pacientes com leishmaniose disseminada apresentam doença mucosa (Turetz, Machado *et al.*, 2002).

A leishmaniose cutânea difusa se caracteriza por nódulos múltiplos, podendo também ser encontradas lesões tuberosas, placas e raramente

exulcerações, havendo do ponto de vista histopatológico um acúmulo de macrófagos nas lesões e uma abundância de parasitos (Barral-Netto, Barral *et al.*, 1995). A reação de Montenegro é negativa e os pacientes não respondem ao tratamento ou apresentam cura transitória.

Em cerca de 5% dos pacientes com leishmaniose cutânea, concomitante à doença na pele, pode ser detectada a forma mucosa da doença, mesmo meses ou anos após a cura. A leishmaniose mucosa está relacionada a lesões cutâneas múltiplas ou extensas lesões acima da cintura pélvica e ao tratamento não apropriado da doença cutânea (Llanos Cuentas, Cuba *et al.*, 1984). A doença acomete predominantemente a mucosa nasal, porém o palato mole, o palato duro, a gengiva, os lábios e a faringe podem ser comprometidos (Llanos Cuentas, Cuba *et al.*, 1984). Desta forma a leishmaniose mucosa pode apresentar complicações importantes, inclusive lesões desfigurantes na face. Os pacientes com a doença não respondem ao tratamento padrão, sendo este estado amplamente documentado (Carvalho, Johnson *et al.*, 1985).

Estudos epidemiológicos realizados em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar têm mostrado que cerca de 10% dos indivíduos residentes nessas localidades apresentam teste de hipersensibilidade tardia tipo IV para antígeno do parasito, mas não têm evidência clínica de doença (Follador, Araujo *et al.*, 2002). Estes indivíduos têm sido considerados como portadores da forma assintomática da infecção causada pela *L. braziliensis* (Follador, Araujo *et al.*, 2002).

2. Resposta Imune nas Leishmanioses

2.1 *Resposta Imune na Leishmaniose Experimental*

Estudos em modelos experimentais mostraram que a população de células T CD4⁺ é heterogênea e constituída de células que podem ser separadas em linhagens Th1 ou Th2, de acordo com o padrão de citocina secretada (Cherwinski, Schumacher *et al.*, 1987).

Muitas questões relacionadas com a resposta imune à leishmaniose vêm sendo esclarecidas em modelos experimentais murinos e modelos que utilizam células T regulatórias. Os modelos murinos mais empregados nos estudos de leishmaniose são os que utilizam camundongos BALB/c e C57BL/6. Os sistemas imunes dessas linhagens de camundongos desenvolvem diferentes respostas contra a infecção por *L. major*. O BALB/c desenvolve uma resposta essencialmente Th2, o que lhe confere susceptibilidade à infecção. No C57BL/6 uma resposta essencialmente Th1 conferindo resistência à infecção (Bogdan, Gessner *et al.*, 1993; Liew e O'Donnell, 1993; Reed e Scott, 1993; Titus, Theodos *et al.*, 1994; Reiner e Locksley, 1995). Cada uma dessas respostas desencadeadas pelo sistema imune apresenta características próprias, incluindo o ambiente de citocinas. Numa resposta Th1 o ambiente de citocinas é constituído pela interleucina-2 (IL-2), interleucina-3 (IL-3), linfotóxina (TNF- β), GM-CSF e IFN- γ e, na resposta Th2 predominam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13.

A susceptibilidade à infecção por *L. major* no camundongo BALB/c está relacionada com baixa produção de interferon gama (IFN- γ) e altos níveis de interleucina-4 (IL-4), o que direciona uma resposta Th2 e leva à progressão da

doença (Bogdan, Gessner *et al.*, 1993; Liew e O'Donnell, 1993; Reed e Scott, 1993; Titus, Theodos *et al.*, 1994; Reiner e Locksley, 1995). Tem sido proposto que no camundongo BALB/c, uma linhagem única de células T CD4+ possui um receptor específico (V β 4V α 8) que reconhece o LACK - receptor homólogo de *Leishmania* para proteína cinase ativada. Esta linhagem de células é responsável pelo aumento da produção de IL-4 no BALB/c devido a baixa afinidade de seus receptores de células T por peptídeo-MHC (Kopf, Brombacher *et al.*, 1996).

No camundongo C57BL/6 infectado por *Leishmania*, o IFN- γ é uma citocina que está presente em altos níveis, caracterizando resistência à infecção e associando-se à cura.

Em camundongos BALB/c infectados por *L. major*, a citocina IL-4 pode inibir a proteção conferida pelo IFN- γ (Lehn, Weiser *et al.*, 1989; Liew, Millott *et al.*, 1989), e os camundongos desta mesma linhagem infectados por *L. braziliensis* produzem níveis significativamente mais baixos de IL-4 do que o BALB/c infectado por *L. major*. Portanto, o camundongo BALB/c infectado por *L. braziliensis* deve controlar a infecção somente com os níveis de IFN- γ que eles produzem (Titus, Theodos *et al.*, 1994).

2.2 Resposta Imune na Leishmaniose Visceral Humana

A leishmaniose visceral é uma forma associada com uma variedade de alterações imunológicas, como uma supressão específica da resposta imune celular à antígenos de *Leishmania*, e a ausência de produção *in vitro* de IFN- γ e IL-2 (Carvalho, Barral *et al.*, 1992). Devido a essas disfunções imunológicas, os

pacientes apresentam uma forma grave da doença e, se não tratados com tratamento eficaz, podem evoluir para a morte (Badaro, Jones, Carvalho *et al.*, 1986).

O controle e a cura da leishmaniose são dependentes da resposta imune celular, e a ausência desta se associa com multiplicação e disseminação do parasito, como observado na leishmaniose visceral e na leishmaniose cutânea difusa. A ausência de uma resposta imune celular na leishmaniose visceral contrasta com os altos títulos de anticorpos que não têm papel protetor na infecção (El Amin, Wright *et al.*, 1986; Ghosh, Dasgupta *et al.*, 1995; Shiddo, Huldts *et al.*, 1996), mas são importantes marcadores de infecção e de doença. Em virtude da limitação existente para a documentação de parasitos, a presença de um quadro clínico típico de doença associado à documentação de anticorpo contra antígenos parasitários é um critério amplamente aceito para diagnóstico da leishmaniose visceral (Carvalho, Barral *et al.*, 1992). Pacientes com leishmaniose visceral têm níveis elevados de IL-4 no soro, (Zwingenberger, Harms *et al.*, 1990), além disso, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) destes pacientes não proliferam ou produzem IFN- γ em resposta ao estímulo com antígeno de *Leishmania* (Carvalho, Badaro *et al.*, 1985). A IL-10 por sua vez inibe a produção de IFN- γ (Fiorentino, Bond *et al.*, 1989) e age sinergisticamente com IL-4 na inibição da hipersensibilidade tardia (Powrie, Menon *et al.*, 1993). Após a cura terapêutica os pacientes com leishmaniose visceral restauram a resposta linfoproliferativa, suas células passam a produzir IFN- γ e IL-2 *in vitro* (Carvalho, Teixeira *et al.*, 1981; Carvalho, Badaro *et al.*,

1985), ocorrendo também um aumento na produção de IL-1 e de TNF- α (Ho, Badaro *et al.*, 1992).

A leishmaniose visceral é uma doença complexa associada com muitos fatores que podem causar imunossupressão, com a presença de complexos imunes circulantes (Carvalho, Andrews *et al.*, 1983; Galvao-Castro, Sa Ferreira *et al.*, 1984).

Nos pacientes com leishmaniose visceral a principal deficiência imune é a incapacidade de desenvolver uma resposta Th1, que é a responsável pelo controle da infecção (Carvalho, Badaro *et al.*, 1985). A IL-12 é a citocina mais importante neste tipo de resposta, a ausência desta citocina pode ser um fator importante nas alterações imunológicas observadas na leishmaniose visceral (Bacellar, D'Oliveira *et al.*, 2000); uma vez que é a IL-12 que determina a derivação para uma resposta Th1. Nos indivíduos com infecção assintomática, ou com a forma oligosintomática que evolui para cura, pode ser detectada uma resposta Th1 com produção de IL-2 e de IFN- γ (Carvalho, Barral *et al.*, 1992). Nos pacientes que evoluem para a leishmaniose visceral, mesmo na fase inicial da infecção, a resposta Th1 está ausente (Carvalho, Barral *et al.*, 1992). A IL-12 e a IL-10 são citocinas chaves em determinar a resposta imune na infecção por *L. chagasi*. A adição de IL-12 e a neutralização da IL-10 utilizando anticorpos monoclonais específicos restauram a proliferação linfocitária e a produção *in vitro* de IFN- γ de linfócitos de pacientes com leishmaniose visceral. Diferentemente, a adição de IL-10 em cultura de células de pacientes curados de leishmaniose visceral suprime essas funções linfocitárias. A adição da IL-10

bloqueia também *in vitro* a capacidade da IL-12 de restaurar a produção de IFN- γ (Bacellar, D'Oliveira *et al.*, 2000).

2.3 Resposta Imune da Leishmaniose Tegumentar Humana

Assim como em camundongos, no homem, o controle da infecção contra a *Leishmania* é mediado por células Th1, através da ativação de macrófagos por IFN- γ . Contudo, a doença humana é ainda mais complexa, devido ao espectro clínico e imunológico amplo e pelas diversas variações do ambiente, do parasito ou do hospedeiro, as quais podemos citar: 1- variações nas populações ou no número de vetores transmissores. 2- tamanho do inóculo de parasitos. 3- efeito da saliva dos flebótomos na infecção inicial. 4- espécies, cepas e variações genéticas do parasito. 5- estado nutricional do hospedeiro. 6- co-infecções. 7- variações genéticas do hospedeiro que interfiram na resposta imune. Alguns desses aspectos vêm sendo estudados e têm demonstrado que uma deficiência da resposta imune Th1, protetora, está relacionada com multiplicação do parasito, estando associada às formas mais graves de leishmaniose, como na leishmaniose visceral e na leishmaniose cutânea difusa. Nessas formas clínicas, a ausência da produção de IL-2 e IFN- γ foi bem documentada (Carvalho, Badaro *et al.*, 1985; Barral, Costa *et al.*, 1995), e que resulta em uma deficiência de ativação de macrófagos e disseminação do parasito. Na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa há uma forte resposta Th1, a qual está associada ao controle da multiplicação do parasito (Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998); (Bacellar, Lessa *et al.*, 2002). A forma

mucosa da doença é ainda mais agressiva, sendo a resposta Th1 mais intensa do que na leishmaniose cutânea (Bacellar, Lessa *et al.*, 2002). Como ocorre em outras doenças infecciosas e parasitárias, o estudo da resposta imune de indivíduos que apresentam uma resposta imune à infecção, e que não desenvolvem doença aparente, consiste numa boa forma de entender os mecanismos imunológicos de proteção contra a infecção.

Os indivíduos infectados pela *Leishmania* podem responder de diferentes maneiras à infecção, deflagrando padrões distintos de resposta imune que podem resultar em um amplo espectro de manifestações clínicas. As citocinas produzidas por células Th1 resultam da presença de moduladores secretados pelas células Th2 e vice-versa. Desta forma, a predominância do padrão de citocina secretada após a infecção pelo parasito pode ter relação com a imunopatogênese de determinadas doenças (Mosmann, Cherwinski *et al.*, 1986). As citocinas associadas com a resposta do Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- β) são responsáveis pela imunidade mediada por células e estão envolvidas com o fenômeno de hipersensibilidade tardia. A resposta do Th2 se caracteriza pela produção de citocinas como a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que se associam com a resposta humoral. A IL-4 parece mediar múltiplas funções biológicas numa variedade de tipos celulares, sendo inicialmente descrita como um fator estimulador de células B e, além disso estimula a proliferação de células T e sinergiza com a IL-13 para otimizar o crescimento de mastócitos (Lehn, Weiser *et al.*, 1989). Conjuntamente com a IL-13, a IL-4 se constitui também no principal estímulo para o linfócito B se diferenciar em célula produtora de imunoglobulina E.

O principal mecanismo de defesa contra a *Leishmania* é a imunidade celular, uma vez que este parasito é fagocitado pelos macrófagos. Nestas células o parasito modula e inibe a resposta macrobiciada assim como influencia a resposta imune adaptativa. Em infecções por *Leishmania*, ocorre inicialmente estimulação da produção de IFN- γ pelas células NK por um mecanismo dependente de IL-12. Assim, no curso da doença, essas células podem ser a fonte inicial de IFN- γ , crítica para a contenção da proliferação parasitária (Gorak, Engwerda *et al.*, 1998).

Muitas evidências mostram que as citocinas IFN- γ e TNF- α são importantes para o controle da leishmaniose, controlando a multiplicação do parasito, mas também podem estar envolvidas na patogênese da doença.

A magnitude da resposta imune na leishmaniose cutânea depende sobretudo da duração da doença, espécie do parasito e espécie do vetor envolvidos (Carvalho, Correia Filho *et al.*, 1995). Pacientes com leishmaniose cutânea apresentam resposta imune caracterizada por forte resposta celular com evidência de altos níveis de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ), teste de Montenegro positivo e alta resposta linfoproliferativa em presença de antígeno de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* (Carvalho, Badaro *et al.*, 1985). Estudos prévios avaliando pacientes com leishmaniose cutânea têm documentado que a resposta de célula T, determinada por hipersensibilidade tardia e proliferação linfocitária, é preservada nesta doença (Castes, Agnelli *et al.*, 1983; Carvalho, Johnson *et al.*, 1985).

Indivíduos com leishmaniose mucosa representam o pólo hiperérgico da doença, com altos níveis de TNF- α e IFN- γ , resposta linfoproliferativa e

resposta ao teste de Montenegro maiores do que aqueles encontrados nos pacientes com leishmaniose cutânea (Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998). Esses dados, em conjunto, sugerem que a resposta imunológica elevada e não modulada está envolvida na patogênese desta doença. Os motivos pelos quais pacientes com leishmaniose cutânea ou leishmaniose mucosa apresentam resposta imune acentuada e não modulada não é bem elucidado. Múltiplos fatores podem contribuir para a hiperativação da resposta imunológica nesses pacientes, dentre eles: 1- desequilíbrio entre os sinais co-estimulatórios positivos (B7-CD28), (CD40-CD40L) e negativos (B7-CTLA-4). 2- aumento da produção de citocinas envolvidas na ativação e proliferação linfocitária (IL-2, IL-12 e IL-15). 3- diminuição da apoptose e a alta frequência de células T ativadas.

2.4 Resposta imune a antígenos específicos de *Leishmania*

Alguns antígenos recombinantes de *Leishmania* induzem resposta imune Th1 e outros induzem uma resposta Th2, estes estimulando principalmente a produção de IL-10. A maioria dos estudos sobre antígenos de *Leishmania* tem como objetivo identificar moléculas do parasito que induzem uma resposta Th1 e podem conseqüentemente serem utilizadas em vacinas (Skeiky, Kennedy *et al.*, 1998), baseado no conhecimento de que essa resposta está envolvida na ativação de macrófagos e conseqüentemente destruição da *Leishmania* e controle da infecção.

Dentre os antígenos recombinantes indutores de resposta Th1, destacam-se o LeIF (*Leishmania* homologue of the eukaryotic initiation factor) que induz produção de IL-12 (Skeiky, Guderian *et al.*, 1995; Skeiky, Kennedy *et al.*, 1998) contribuindo para a diferenciação de células Th0 para células Th1. A Gp63 é uma metaloprotease expressa em abundância nas várias espécies de *Leishmania*, capaz de induzir proliferação linfocitária e produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, em indivíduos curados de leishmaniose (Russo, Burns *et al.*, 1991), assim como em camundongos (Walker, Scharon-Kersten *et al.*, 1998).

Ainda em relação a antígenos indutores de resposta imune Th1, com produção de IFN- γ , estão os antígenos H2A e a Proteína “Q”.

O H2A é uma histona presente em promastigotas de *Leishmania infantum* com massa molecular de 14 kDa (Soto, Requena *et al.*, 1992; Nieto, Garcia-Alonso *et al.*, 1999) que foi utilizada na forma recombinante (rH2A) para imunodiagnóstico de cães infectados por *L. infantum*. Esta histona é mais abundante em formas promastigotas na fase logarítmica de crescimento (Soto, Requena *et al.*, 1992; Soto, Requena *et al.*, 1995; Berberich, Requena *et al.*, 1997; Berberich, Machado *et al.*, 1998). Em cães infectados com *L. infantum* foi documentada alta reatividade sorológica contra a histona H2A, indicando que anticorpos anti-histona podiam estar envolvidos no processo patológico direcionando para a progressão da doença (Nieto, Garcia-Alonso *et al.*, 1999).

O antígeno recombinante proteína “Q” é uma proteína quimérica formada pela fusão genética de cinco determinantes antigênicos de quatro proteínas de *Leishmania*: LiP2a, LiP2b, Lip0 e a histona H2A. Os fragmentos que formam este

antígeno recombinante, a proteína “Q”, são altamente imunogênicos durante a infecção natural por *L. infantum* em cães (Soto, Requena *et al.*, 1998).

Recentemente foram produzidos alguns antígenos recombinantes fortes indutores de IL-10, que são reconhecidos por anticorpos e têm potencial de serem utilizados em testes sorológicos como o ELISA e em vacinas contra *Leishmania*.

O LACK e o KMP11, antígenos recombinantes de *Leishmania*, induzem uma resposta Th2. O LACK (*Leishmania* homologue of the mammalian receptor for activated C kinase-reactive) constitui cerca de 0,03% do total de proteínas da *Leishmania* e sua expressão é essencial para que ocorra infecção. O KMP11 é uma proteína de membrana com massa molecular de 11 kDa que foi primeiramente descrita em *L. donovani* (Jardim, Funk *et al.*, 1995; Jardim, Hanson *et al.*, 1995). Em 1997, Berberich e colaboradores desenvolveram estudos para analisar aspectos moleculares e imunológicos da proteína KMP11 em *L. infantum* (Berberich, Requena *et al.*, 1997), sendo esta proteína utilizada posteriormente no diagnóstico de cães infectados naturalmente por *L. infantum* (Nieto, Garcia-Alonso *et al.*, 1999).

A maioria dos estudos com proteínas recombinantes de *Leishmania* tem como objetivo identificar antígenos que possam ser utilizados em testes sorológicos para diagnóstico ou que induzam uma resposta Th1 e consequentemente possam ser usados em vacinas (Skeiky, Kennedy *et al.*, 1998).

O principal objetivo desse trabalho foi caracterizar a resposta imune para alguns antígenos recombinantes de *Leishmania* e investigar aspectos relacionados com a modulação da resposta imune na leishmaniose tegumentar.

3. Objetivo Geral

Caracterizar a resposta imune a antígenos recombinantes de *Leishmania* e identificar aspectos relacionados à modulação da resposta imune na leishmaniose tegumentar.

3.1 Objetivos Específicos

3.1.1 Avaliar a eficácia de testes sorológicos com antígenos recombinantes de *Leishmania* rH2A e KMP11 para identificar infecção sub-clínica por *L. chagasi* e leishmaniose visceral.

3.1.2 Avaliar o potencial de antígenos recombinantes de *Leishmania* (LACK e KMP11) em modular a produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa.

3.1.3 Avaliar o papel das moléculas co-estimulatórias (HLA-DR, CD80, CD86, CD40, CD40L e CTLA-4) na modulação da resposta imune na leishmaniose tegumentar.

3.1.4 Determinar o papel das citocinas IL-2, IL-12 e IL-15 em modular a produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose cutânea e com leishmaniose mucosa.

4. Relevância:

Estudos utilizando antígenos recombinantes no diagnóstico sorológico da leishmaniose vêm sendo desenvolvidos e os resultados que se tem observado demonstra que este caminho a ser seguido pode revelar um método diagnóstico simples, eficiente, sensível e capaz de atuar como marcador de resposta terapêutica. Portanto, um estudo que caracterize a resposta imune a antígenos recombinantes de *Leishmania* se torna relevante.

O principal mecanismo de defesa contra a *Leishmania* é a imunidade celular, uma vez que este parasito é fagocitado pelos macrófagos. Tem sido demonstrado que a deficiência de uma resposta imune Th1 está relacionada com multiplicação do parasito e, conseqüentemente com as formas graves da leishmaniose. Tem sido sugerido que a resposta imunológica elevada e não modulada está envolvida na patogênese da doença mucosa. Múltiplos fatores podem contribuir para a intensa resposta imunológica nesses pacientes como, o desequilíbrio entre os sinais co-estimulatórios positivos e negativos, o aumento da produção de citocinas envolvidas na ativação e proliferação linfocitária. Então, torna-se relevante o estudo do papel de moléculas co-estimulatórias (B7 – CD28; CD40 – CD40L; B7 – CTLA-4), determinar o papel das citocinas (IL-2, IL-12 e IL-15) envolvidas na ativação e proliferação linfocitária em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa.

5. Publicação 1

A hipótese desse estudo é que antígenos recombinantes de *Leishmania* podem ser usados em diagnóstico sorológico e servir como marcadores de atividade de doença na leishmaniose visceral.

Resumo da Publicação 1:

Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral *leishmaniasis*.

Testes sorológicos com antígeno bruto ou recombinante de *Leishmania* são importantes ferramentas para o diagnóstico da infecção por *Leishmania*. Entretanto, anticorpos para estes antígenos não são marcadores de atividade de doença, desde que são freqüentemente observados em indivíduos com infecção sub-clínica por *L. chagasi* e após tratamento esses anticorpos apresentam queda nos seus níveis. Nesse estudo, a resposta imune de anticorpo IgG contra três antígenos recombinantes de *Leishmania* (rH2A, KMP11 e proteína “Q”) foram avaliados no soro de indivíduos com infecção sub-clínica por *L. chagasi*, indivíduos sadios não-residentes em área endêmica, pacientes com doença de Chagas e em pacientes com leishmaniose visceral (LV) antes e após o tratamento, utilizando o ELISA. A sensibilidade do teste sorológico para diagnóstico da LV no grupo de 37 soros foi de 100% com os três antígenos. Os títulos de anticorpos IgG específicos para os antígenos avaliados caíram significativamente após o tratamento. Enquanto a maioria dos indivíduos com infecção sub-clínica por *L. chagasi* têm anticorpos para rH2A e para a proteína “Q”, somente 1 de 15 indivíduos teve anticorpos para o KMP11. Esses dados indicam que o KMP11 pode ser utilizado para distinguir infecção

sub-clínica por *L. chagasi* de leishmaniose visceral ativa, além de poder servir como marcador sorológico de resposta terapêutica.

6. Publicação 2

A hipótese do presente estudo é que antígenos recombinantes com propriedades imuno modulatórias são capazes de modular a resposta inflamatória de pacientes com LM ou LC.

Resumo da Publicação 2:

Effect of LACK and KMP11 on IFN- γ production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal *Leishmaniasis*.

As propriedades imuno moduladoras dos antígenos recombinantes Kinetoplasmídeo proteína de membrana – 11 (KMP11) e receptor homólogo para proteína C kinase ativada da *Leishmania* (LACK) em pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e em pacientes com leishmaniose mucosa (LM) foram avaliadas. A média das concentrações de interferon- γ (IFN- γ) nos sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) de pacientes com LM e LC foram 5625 ± 2333 pg/ml e 4422 ± 3665 pg/m, respectivamente. IFN- γ não foi detectado em sobrenadantes de CMSP estimuladas com KMP11 ou LACK. A concentração de interleucina-10 (IL-10) em sobrenadantes de CMSP estimuladas com SLA, KMP11 e LACK em pacientes com LM foi 13 ± 12 pg/ml, 285 ± 388 pg/ml e 802 ± 483 pg/ml, respectivamente. A adição de KMP11 ou LACK as CMSP, estimuladas com SLA, de pacientes com LC e LM aumentou a produção de IL-10 ($P < 0.05$). A adição de KMP11 diminuiu as concentrações de IFN- γ em 52% em pacientes com LC e em 19% de pacientes com LM. A adição de LACK às culturas estimuladas com SLA diminuiu as

concentrações de IFN- γ em 58% nos pacientes com LC e em 30% nos pacientes com LM. A neutralização de IL-10 inibiu o efeito modulador do LACK e do KMP11 sobre a produção de IFN- γ . A capacidade moduladora do LACK e do KMP11 pode servir para atenuar as doenças inflamatórias crônicas. Entretanto, em algumas condições clínicas, como demonstrado na LM, estas moléculas não são capazes para suprimir a resposta de IFN- γ , mesmo induzindo a produção de IL-10.

7. Publicação 3

A hipótese desse estudo é que na leishmaniose mucosa a diferenciação de células T não é apropriadamente modulada e a manutenção de uma resposta inflamatória persistente leva ao dano tecidual.

Resumo da Publicação 3:

Differential Immune Regulation of Activated T Cells Between Cutaneous and Mucosal *Leishmaniasis* as a Model for Pathogenesis.

Na leishmaniose cutânea e mucosa existe uma predominância da resposta imune Th1 e forte resposta inflamatória no sítio da lesão com poucos parasitos. Essa intensa resposta Th1 é mais evidente na leishmaniose mucosa quando comparada com a leishmaniose cutânea e vários fatores imunológicos podem explicar os mecanismos envolvidos nesse processo. No presente estudo, a frequência de células expressando moléculas co-estimulatórias e marcadores de ativação de células T foram avaliados nos dois grupos de pacientes – leishmaniose mucosa e leishmaniose cutânea. Adicionalmente, a capacidade dos anticorpos, α -IL-2, α -IL-12 e α -IL-15, para neutralizar as seguintes citocinas IL-2, IL-12 e IL-15 e modular a produção de IFN- γ em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) estimuladas com antígeno de *Leishmania* (SLA) e PPD foi determinada. Nenhuma diferença foi encontrada na frequência de monócitos expressando HLA-DR ou moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86, CD40 ou CD40-L). Interessantemente, no grupo de leishmaniose cutânea, anti-IL-2 e anti-IL-15 suprimiram significativamente a produção de IFN- γ antígeno-específica nas CMSP, enquanto que no grupo de

leishmaniose mucosa somente anti-IL-2 suprimiu a produção de IFN- γ . Além disso, a supressão da produção de IFN- γ por anti-IL-2 no grupo de leishmaniose cutânea foi mais significativa do que no grupo de leishmaniose mucosa ($P < 0.05$). Finalmente, a alta frequência de células T CD4⁺ expressando os fenótipos CD28⁻, CD69⁺ e CD62L_{low} foram observados em leishmaniose mucosa quando comparados com leishmaniose cutânea. Esse dado indica que a resposta Th1 intensa na leishmaniose mucosa é regulada diferencialmente em relação à leishmaniose cutânea e está associada com o aumento do número de células T ativadas. A nossa hipótese é que essa diferenciação de células T não é apropriadamente modulada e a manutenção de uma resposta inflamatória persistente leva ao dano tecidual observado na leishmaniose mucosa.

8. Discussão

Essa tese é composta por três publicações, as quais apresentam resultados de uma linha de pesquisa que visa avaliar aspectos relacionados à resposta imune na leishmaniose.

A primeira publicação teve como objetivo avaliar a capacidade dos testes sorológicos com antígenos recombinantes de *Leishmania* (rH2A e KMP11) de servir no diagnóstico diferencial entre os pacientes com leishmaniose visceral e os indivíduos com infecção sub-clínica por *L. chagasi*.

A leishmaniose visceral é uma doença que, mesmo com tratamento eficiente, ainda possui um alto índice de letalidade. Este fato se deve à falha de um diagnóstico precoce e correto da doença, que muitas vezes é confundida com outras enfermidades. Por isso, um teste sorológico que seja capaz de diagnosticar a leishmaniose visceral com precisão tem sido objetivo de muitos trabalhos nos últimos anos. A pesquisa por antígenos parasitários capazes de induzir uma resposta imune tem sido predominantemente associada com a identificação de proteínas que podem ser usadas para diagnóstico sorológico ou desenvolvimento de vacinas (Burns, Scott *et al.*, 1991; Russo, Burns *et al.*, 1991; Skeiky, Kennedy *et al.*, 1998).

Em modelos murinos, várias moléculas candidatas ao uso em vacinas têm sido identificadas através de suas capacidades em prover proteção; e proteínas associadas à membrana como gp46, gp72, gp63, LPS e KMP11, e outras proteínas como P-2 / A-2, P-4 e P-8, expressas preferencialmente no estágio de amastigotas, têm sido testadas (Coutinho, Oliveira *et al.*, 1996).

Estudos prévios em áreas de transmissão de *L. chagasi* têm mostrado que menos de 15% dos indivíduos infectados com *L. chagasi* desenvolvem a forma clássica da leishmaniose visceral e que a maioria dos indivíduos irão desenvolver a forma sub-clínica da infecção (Evans, Teixeira *et al.*, 1992; D'Oliveira Junior, Costa *et al.*, 1997). Testes sorológicos com extrato antigênico ou antígenos recombinantes de *Leishmania* são importantes ferramentas para o diagnóstico da leishmaniose visceral, mas até o momento estes testes não têm capacidade de identificar a doença, dos indivíduos somente infectados com *Leishmania*, com a forma assintomática da infecção. Por outro lado, anticorpos contra *Leishmania* persistem por muito tempo após o tratamento da doença, impedindo que técnicas sorológicas possam ser utilizadas no seguimento da resposta ao tratamento da leishmaniose visceral (Carvalho, Barral *et al.*, 1992).

Vários antígenos recombinantes de *Leishmania* são reconhecidos por anticorpos de pacientes com leishmaniose visceral e entre estes antígenos está o rK39 – proteína conservada entre espécies de *Leishmania* mais comumente associada com leishmaniose visceral. Estudos anteriores que avaliaram a reatividade do rK39 sugeriram que este antígeno poderia discriminar infecção sub-clínica por *L. chagasi* de doença ativa (Badaro, Benson *et al.*, 1996). Entretanto, no estudo realizado com o rK39 que avaliou a capacidade deste antígeno em distinguir infecção sub-clínica de doença, os indivíduos com a infecção sub-clínica foram selecionados com base no teste cutâneo positivo e já foi mostrado previamente que anticorpos anti-*Leishmania* diminuem paralelamente à conversão do teste cutâneo de Montenegro (Carvalho, Barral *et al.*, 1992), não sendo possível a discriminação entre infecção por *Leishmania*

e leishmaniose visceral citada no estudo utilizando como grupo de estudo indivíduos com infecção sub-clínica com teste cutâneo positivo.

Em um outro estudo onde foram comparados os resultados dos testes de ELISA para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral mediterrânea utilizando dez antígenos recombinantes ou purificados de *Leishmania* (Maalej, Chenik *et al.*, 2003), foram avaliados indivíduos saudáveis (como controles negativos), pacientes com outras doenças infecciosas agudas e pacientes com leishmaniose visceral mediterrânea. O rH2A está dentre os antígenos avaliados neste estudo e a sensibilidade encontrada foi de 100% para diagnóstico da leishmaniose visceral, assim como a sensibilidade encontrada no nosso estudo com este mesmo antígeno. No entanto, vale ressaltar que este estudo citado não avaliou indivíduos com infecção sub-clínica e não tinha o objetivo de verificar a capacidade dos antígenos em estudo, de realizar diagnóstico diferencial.

Dados de estudos prévios com o KMP11 e com a proteína “Q” revelaram que o KMP11 proveniente de *T. cruzi* é um antígeno imunodominante altamente reconhecido pelo soro de pacientes com leishmaniose e com doença de Chagas (Molano, Alonso *et al.*, 2003) e que os fragmentos de proteína que formam a proteína “Q” são altamente imunogênicos durante a infecção natural por *L. infantum* em cães infectados com leishmaniose visceral (Requena, Alonso *et al.*, 2000).

Os resultados da primeira publicação que compõe esta tese mostraram que os antígenos recombinantes de *Leishmania*, rH2A, KMP11 e proteína “Q”, podem ser usados para realizar diagnóstico da leishmaniose visceral, uma vez

que o grupo de soros dos pacientes com leishmaniose visceral utilizados neste estudo (n=37) foi positivo ao teste do ELISA para IgG (sensibilidade de 100%).

Ainda nesse estudo, avaliamos a capacidade dos antígenos recombinantes de *Leishmania* em discriminar a infecção sub-clínica por *L. chagasi* e a leishmaniose visceral. Estudos anteriores têm mostrado que os níveis de anticorpos podem permanecer positivos durante muitos anos após tratamento (Carvalho, Barral *et al.*, 1992) e no presente estudo demonstramos uma queda significativa dos níveis de anticorpos IgG para os antígenos recombinantes rH2A, KMP11 e proteína “Q” após 60 dias da terapia com antimônio, num grupo de 15 soros de pacientes com LV. A idéia de que a análise da reatividade contra essas proteínas durante o tratamento com antimônio pode ser usada como marcador de resposta terapêutica para leishmaniose visceral é suportada pelo dado anterior. Dentre os três antígenos recombinantes avaliados, o KMP11 foi o que melhor se apresentou como marcador de resposta terapêutica.

A hipótese da segunda publicação é de que antígenos recombinantes com propriedades imuno modulatórias são capazes de modular a resposta inflamatória de pacientes com leishmaniose mucosa ou leishmaniose cutânea. A ativação macrofágica por IFN- γ tem sido reconhecida como o principal mecanismo para matar a *Leishmania* (Nathan, Murray *et al.*, 1983). Respostas imunológicas para vários antígenos recombinantes de *Leishmania* têm sido avaliadas, e ênfase tem sido dada para a identificação de antígenos associados com a resposta imune Th1. Antígenos como gp-63, gp-42, hsp-70 e hsp-83 têm sido descritos como antígenos de *Leishmania* que induzem principalmente a

produção de IFN- γ (Burns, Scott *et al.*, 1991; Russo, Burns *et al.*, 1991; Skeiky, Kennedy *et al.*, 1998). Na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa, altos níveis de IFN- γ e TNF- α são produzidos, macrófagos são ativados e, a resposta imune não modulada pode estar associada com dano tecidual (Bacellar, Lessa *et al.*, 2002). O conhecimento que a imunopatogênese da leishmaniose cutânea e da leishmaniose mucosa é mediada por uma resposta imune exacerbada e não controlada, tem aberto perspectiva para o estudo de moléculas que tenham a capacidade de regular a resposta imune. O interesse na identificação de moléculas que possam modular a resposta imunológica tem também, aumentado pela documentação de que algumas infecções como a causada pelo *S. mansoni* tem a propriedade de modular tanto a resposta tipo 1 como tipo 2 e também de atenuar doenças inflamatórias e doenças autoimunes. Por exemplo, tem sido observado que camundongos NOD infectados com *S. mansoni* ou os quais ovos de *S. mansoni* foram inoculados desenvolvem menos diabetes do que animais controles (Cooke, Tonks *et al.*, 1999) e que a infecção por esse parasito atenua as manifestações clínicas da encefalite autoimune experimental, modelo animal da esclerose múltipla (La Flamme, Ruddenklau *et al.*, 2003). Mais recentemente, tem sido observado que a infecção pelo *S. mansoni* diminui a resposta tipo 2 a aeroalérgenos (Araujo, Hoppe *et al.*, 2004) e atenua as manifestações clínicas da asma (Medeiros, Almeida *et al.*, 2004). Essa propriedade que tem o *S. mansoni* de modular tanto a resposta tipo 1 quanto a resposta tipo 2 tem sido em grande parte relacionada com a produção de IL-10. Esta citocina também está associada à susceptibilidade à infecção por parasitos como *Toxoplasma gondii* (Sher, Gazzinelli *et al.*, 1992), *Trypanosoma*

cruzi (Silva, Morrissey *et al.*, 1992), além do *Schistosoma mansoni* (Sher, Fiorentino *et al.*, 1991; Araujo, De Jesus *et al.*, 1996) exemplificado anteriormente.

A IL-10 é uma citocina produzida por células Th2 (Fiorentino, Bond *et al.*, 1989) e por macrófagos, que suprime função dos macrófagos e as respostas de células T (Bogdan, Vodovotz *et al.*, 1991; Fiorentino, Zlotnik *et al.*, 1991; Gazzinelli, Oswald *et al.*, 1992) e também inibe a produção de citocinas por células Th1 (Fiorentino, Bond *et al.*, 1989). A IL-10 é a principal citocina reguladora da resposta imune celular e tem sido documentado que a modulação da resposta imune por IL-10 protege os animais da destruição tecidual em doenças auto-imunes como diabetes e na encefalite experimental (Pauza, Neal *et al.*, 1999; Yang, Xu *et al.*, 2000). Nesta publicação nós mostramos que dois antígenos recombinantes, LACK e KMP11, que induzem a produção de IL-10, são capazes de modular a produção de IFN- γ significativamente nos pacientes com leishmaniose cutânea ($p < 0.05$) mas, nos pacientes com leishmaniose mucosa a modulação dos níveis de IFN- γ não foram significantes com nenhum desses antígenos.

Outro achado deste estudo foi de que o LACK e o KMP11 agem predominantemente nos macrófagos e que a produção de IL-10 pode ocorrer independente das células Th2 e podem induzir a produção de IL-10 durante a doença ativa. A produção de IL-10 após estimulação com LACK e KMP11 se deu com uma maior frequência por células CD14+ do que por células T CD4+ ou T CD8+. Nos pacientes com a forma mucosa, a IL-10 produzida após estimulação por esses antígenos apresenta pequeno efeito supressor nos

níveis de IFN- γ e, o dado de que pacientes com leishmaniose mucosa apresentam mais células T CD4+ ativadas do que pacientes com leishmaniose cutânea também pode explicar, em parte, esta incapacidade de modulação da produção de IFN- γ nesses pacientes.

A hipótese da terceira publicação é que a diferenciação de células T não é apropriadamente modulada e a manutenção de uma resposta inflamatória persistente leva ao dano tecidual. Para isso foi avaliada a frequência de células expressando moléculas co-estimulatórias e marcadores de ativação de células T nos grupos de pacientes com leishmaniose mucosa ou leishmaniose cutânea. A nossa hipótese é que o dano tecidual observado na leishmaniose mucosa é devido à resposta inflamatória persistente e não-modulada, com altos níveis de TNF- α e IFN- γ . Vários fatores podem ser responsáveis por uma resposta imune intensa como a documentada na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa, tendo os aspectos relacionados com a apresentação antigênica um papel importante na magnitude da resposta imune. Foi demonstrada a capacidade das células dendríticas (células de Langerhans) em camudongos de migrarem do sítio de infecção para o linfonodo e se constituírem células apresentadoras de antígeno com grande potência, sendo essa função, em grande parte, mediada pela expressão de moléculas co-estimulatórias (Moll, 2000). Nesse contexto tem sido documentado que a interação entre CD40-CD40L é fundamental para ocorrência da resistência da *L. major*, desde que animais deficientes de CD40 ou CD40L são altamente susceptíveis à infecção por *L. major*. No presente estudo moléculas co-estimulatórias foram estudadas, com o objetivo de avaliar se uma maior frequência de células expressando

essas moléculas, poderia estar relacionada com a resposta imune intensa Th1 documentada em pacientes com a forma mucosa. Já foi demonstrado em estudos anteriores que o bloqueio de CTLA-4 na leishmaniose experimental leva à secreção de IL-12 e IFN- γ (Murphy et al., 1998). No presente estudo, mostrou uma tendência à diminuição da freqüência de células T CD4+ expressando CTLA-4 nos pacientes com leishmaniose mucosa comparados com células de pacientes com leishmaniose cutânea. Na análise por citometria de fluxo foi possível avaliar a freqüência de células que expressam HLA-DR, CD80, CD86, CD40, CD40L e CTLA-4. A freqüência de células expressando HLA-DR foi igual para os grupos de pacientes em estudo. Em relação à freqüência de células CD14+, apresentadoras de antígeno, expressando CD80, CD86, CD40 e de células T CD4+ expressando CD40L foi maior nos pacientes com leishmaniose mucosa do que nos de cutânea, no entanto essas diferenças não alcançaram uma significância estatística. Em conclusão, diferenças na expressão dessas moléculas co-estimulatórias entre pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa não foram observadas.

Como se sabe, a IL-12 está entre as citocinas que participam da diferenciação, proliferação e ativação de células T, sendo a principal citocina responsável no desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1. Além disso, na pleurite tuberculosa humana (Locksley, Pingel *et al.*, 1999) e na hanseníase tuberculosa (Coutinho, Pirmez *et al.*, 2002) tem sido demonstrada produção de IL-12 e na infecção por *Leishmania* localizada esta citocina é importante na resposta tecidual do hospedeiro (Melby, Andrade-Narvaez *et al.*, 1996). A neutralização de IL-12 suprimiu a produção de IFN- γ na epidermite por

Staphilococcus (Stuyt, Kim *et al.*, 2003) e a adição exógena de IL-12 restaura *in vitro* a resposta de células T na leishmaniose visceral (Carvalho, Bacellar *et al.*, 1994). Em um estudo realizado no Sudão, foi mostrado que células mononucleares de pacientes com leishmaniose visceral não produzem IL-12 quando estimuladas com antígeno de *L. donovani*, mas após o tratamento, a produção desta citocina é observada (Ghalib, Whittle *et al.*, 1995). A capacidade da anti-IL-12 em modular a produção de IFN- γ induzida por SLA foi pequena nos pacientes com leishmaniose mucosa e nos pacientes com leishmaniose cutânea, o que parece estar relacionado com o fato de que essas células já são diferenciadas em Th1 e não são dependentes da ação de IL-12. Outra citocina da família da IL-12, como a IL-27, pode estar envolvida no processo da modulação da produção de IFN- γ , já que a IL-27 é uma citocina que induz uma maior modulação da resposta imune tanto em células Th1 quanto Th2 (Hunter, Villarino *et al.*, 2004).

A neutralização de IL-2 e IL-15 foi realizada no sentido de determinar se a produção dessas moléculas era necessária para manutenção da resposta imune intensa. Algumas diferenças foram encontradas quanto à capacidade da anti-IL-2 e da anti-IL-15, em modular a resposta imune na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa. Enquanto, que a neutralização de IL-15, citocina com capacidade para estimular a proliferação de células Th1 e / ou Th2 (Carson, Ross *et al.*, 1995; Reiner e Locksley, 1995), diminuiu a produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose cutânea, a neutralização dessa citocina não teve efeito significativo na produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose mucosa. Dentre as similaridades da IL-15 com a IL-2 estão

incluídas: estimulação da proliferação de células T (Grabstein, Eisenman *et al.*, 1994), maturação de células B (Armitage *et al.*, 1995), estimulação da proliferação e ativação de células NK (Carson, Giri *et al.*, 1994; Carson, Ross *et al.*, 1995) e esta citocina sinergiza com a IL-12 facilitando a síntese de IFN- γ e TNF- α (Bamford, Battiata *et al.*, 1996). A IL-2 é importante na mediação de várias funções linfocitárias (Farrar, Fuller-Farrar *et al.*, 1980; Smith, 1984), e as similaridades com a IL-15 se devem ao fato de que o receptor da IL-2 (IL-2R) e IL-15R usam a mesma cadeia β (Carson, Giri *et al.*, 1994). Embora a neutralização de IL-2 tenha modulado a produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, a supressão dessa citocina foi significativamente maior nos pacientes com leishmaniose cutânea. Esses dados indicam que as células T de pacientes com leishmaniose mucosa têm uma dependência menor de IL-2 e de IL-15, sugerindo que essas células T estão em fase final de ativação celular. A observação da existência de uma maior frequência de células CD4+ expressando marcadores de ativação celular serve de base para essa hipótese. Adicionalmente, a neutralização de IL-2 foi mais eficaz em suprimir a produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose cutânea, do que em pacientes com leishmaniose mucosa. Após a estimulação com SLA a neutralização dessa citocina reduziu de modo significativo a produção de IFN- γ em células estimuladas com PPD, indicando que a capacidade da célula de ser modulada, tem até certo ponto relação com o antígeno, através do mecanismo de apresentação antigênica.

O conhecimento de que diferentes populações celulares de células T CD4+ influenciam diferentes respostas imunológicas e conseqüentemente

diferentes cursos de infecção têm estimulado estudos com o objetivo de se conhecer mecanismos de controle dessa polaridade ou de limitar determinado tipo de resposta, tendo em vista o desenvolvimento de tratamento para doenças infecciosas ou atopias. Embora muitas citocinas imuno – moduladoras tenham sido inicialmente relacionadas com determinada população de células T, sabe-se atualmente que dependendo do contexto, alguns desses imunomoduladores têm efeitos nas funções de células T que não estão relacionadas com o desenvolvimento de uma determinada população de células. Dois exemplos recentes são IL-23 e IL-27, citocinas que são estruturalmente relacionadas a IL-12 mas que têm uma ação limitada em promover uma resposta do tipo Th1 clássica (Robinson e O'garra, 2002; Trinchieri, Pflanz *et al.*, 2003). A IL-23 tem a capacidade de estimular células T CD4+ a produzir IL-17, que tem um importante papel no desenvolvimento e na manutenção da auto-imunidade (Kolls e Linden, 2004). No entanto, a principal função da IL-27 *in vivo* é limitar a intensidade e a duração da resposta imune inata e adaptativa (Villarino, Hibbert *et al.*, 2003). A IL-12 e a IL-27 são citocinas que apresentam homologia em suas estruturas, assim como em seus receptores (Pflanz, Timans *et al.*, 2002; Pflanz, Hibbert *et al.*, 2004) e devido a essas homologias os estudos iniciais sobre a IL-27 revelaram que a produção de IFN- γ por células T CD4+ não primadas e células NK pode ser aumentada e que células T deficientes do receptor para IL-27 (WSX-1) produzem níveis reduzidos de IFN- γ (Yoshida, Hamano *et al.*, 2001).

Na leishmaniose experimental, camundongos resistentes C57BL/6 deficientes do receptor WSX-1 infectados com *L. major* produziram níveis

elevados de IL-4 e apresentaram uma resposta do tipo Th1 tardia, com aumento da lesão (Yoshida, Hamano *et al.*, 2001). Entretanto, numa fase posterior esses animais produziam níveis normais de IFN- γ . Confirmando esses achados, outro estudo mostrou que animais deficientes de WSX-1 cronicamente infectados com *L.major* podem produzir níveis elevados de IFN- γ (Artis, Villarino *et al.*, 2004).

Portanto, esses dados sugerem que o papel de IL-27 no desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 é importante na fase inicial da infecção e é transitória. Apesar da literatura descrever o papel da IL-27 no desenvolvimento de células Th1, já existem evidências que apontam para o fato de que essa citocina pode servir como antagonista para resposta de células T efetoras. Em algumas infecções por parasitos, estudos *in vitro* mostraram que IL-27 tem um importante efeito anti-inflamatório. Animais deficientes do receptor WSX-1 infectados com *T. gondii* apesar de desenvolverem uma resposta normal de células T CD4+ e CD8+ durante a fase aguda da infecção, após 2 semanas esses animais desenvolveram uma doença inflamatória letal com produção elevada de IFN- γ (Villarino, Hibbert *et al.*, 2003) e aumento de uma população de células T altamente ativadas. Outros estudos em modelos experimentais infectados com *T. gondii* e *M. tuberculosis* mostraram que esses animais deficientes do receptor WSX-1 apresentaram uma resposta exagerada de células T, com uma grande produção de IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α que levam a uma doença letal aos animais (Hamano, Himeno *et al.*, 2003; Holscher, Holscher *et al.*, 2005).

O presente estudo mostrou que a resposta Th1 exagerada observada na leishmaniose mucosa é modulada não por IL-10. E diante dos estudos mais recentes sobre IL-27, essa é uma citocina que pode também estar envolvida nessa forte resposta Th1 observada na leishmaniose tegumentar. Portanto, estudos futuros devem ser realizados para avaliar o papel desta citocina no processo inflamatório observado na leishmaniose tegumentar.

9. Conclusões

1. Os antígenos recombinantes de *Leishmania* rH2A, KMP11 e proteína “Q” são reconhecidos pelos soros dos pacientes com leishmaniose visceral (LV) podendo ser utilizados para o diagnóstico sorológico da LV.
2. O teste sorológico com o KMP11 pode ser um método para avaliar doença ativa desde que é negativo na maioria dos indivíduos com infecção sub-clínica por *L. chagasi* e os títulos caem nos indivíduos após tratamento.
3. KMP11 e LACK são antígenos indutores de IL-10, possivelmente com capacidade de modular a produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose cutânea mas, sem ação moduladora na leishmaniose mucosa.
4. A maior produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose mucosa não se relaciona com aumento de moléculas co-estimulatórias indicando que outros mecanismos podem ser responsáveis por essa maior produção.
5. A maior frequência de células T CD4+ ativadas na leishmaniose mucosa, possivelmente impede a apropriada modulação da resposta imune podendo ter participação na manutenção da resposta inflamatória e dano tecidual.

10. Summary

Leishmaniasis, in general, has been well studied and attention has been given to several questions related to immunological aspects such as characterization and modulation of immune response. The main aim of the present thesis was to characterize the immune response to recombinant antigens of *Leishmania* in visceral leishmaniasis and evaluate aspects related to modulation of the immune response in tegumentary leishmaniasis.

Considering the lack of a precise and early phase of disease diagnosis, in the first paper, by performing serological tests, we evaluate the ability of three leishmania recombinant antigens (rH2A, KMP11 e Proteína "Q") to serve as differential diagnosis between sub-clinical *L. chagasi* infection and visceral leishmaniasis. The sensitivity and specificity of the ELISA was 100% when the three recombinant antigens were used. Regarding the ability to serve as differential diagnosis, the KMP11 was the antigen which showed best ability in differentiation between sub-clinical *L. chagasi* infection and visceral leishmaniasis.

In the second paper, we evaluated aspects of immune modulation in patients with cutaneous and mucosal leishmaniasis by stimulating peripheral blood mononuclear cells with soluble leishmania antigen and adding or not LACK and KMP11, IL-10 inducer antigens. The results showed that addition of LACK or KMP11 were able to suppress IFN-gamma production in cell cultures from cutaneous leishmaniasis patients, and this effect was mediated by IL-10 production. In cell cultures from mucosal leishmaniasis patients, addition of

LACK or KMP11 were not able to suppress IFN-gamma production induced by soluble leishmania antigen despite the IL-10 induction by both antigens.

We then evaluate, in the third paper, the role of co-stimulatory molecules, frequency of activated T cells and ability of cytokines (IL-2, IL-12 and IL-15) and CTLA-4 in modulate the IFN-gamma production. We observed that the intensity of the intensity of the Th1 response in mucosal leishmaniasis patients is associated with an increase numbers of activated T cells. And the non-appropriated modulation of these cells and the maintenance of the inflammatory response leads to the tissue damage observed in mucosal leishmaniasis.

Nevertheless, the results shown here contributed to answer questions related to immunological aspects, such as immunodiagnosis and modulation of immune response, from groups of patients with visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis and mucosal leishmaniasis .

11. Anexos

11.1 Anexo 1 – Metodologia Artigo 1:

Soros de 117 pacientes foram utilizados neste estudo. Soro de 37 pacientes com leishmaniose visceral (LV) previamente ao tratamento e de 8 pacientes pré e pós-tratamento foram obtidos de residentes na região peri-metropolitana de Natal, 28 soros foram obtidos de indivíduos com infecção sub-clínica por *L. chagasi* (SC) residentes no Maranhão, no grupo controle foram utilizados 15 soros de pacientes com doença de Chagas e 29 soros de indivíduos sadios residentes em área não-endêmica.

Os soros dos pacientes com leishmaniose visceral foram obtidos de indivíduos residentes na área peri-metropolitana de Natal, cidade localizada na região Nordeste na qual a leishmaniose deixou de ser uma doença limitada a área rural e vem se aproximando de grandes centros urbanos. Estes pacientes com LV tiveram seu diagnóstico confirmado através da presença do parasita no aspirado de medula óssea ou baço e teste sorológico com antígeno bruto positivo.

Os soros dos indivíduos com infecção sub-clínica por *L. chagasi* foram obtidos de residentes no Maranhão, estado que em 1999 registrou o maior número de casos de LV em humanos no país (cerca de 842 doentes) e esta endemia ainda continua em expansão, sendo a Ilha de São Luís a principal área endêmica da LV no Maranhão. Estes soros reagiram com o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) e a ausência de desenvolvimento da doença clássica, confirmou o diagnóstico de infecção sub-clínica.

Os soros dos pacientes com doença de Chagas foram obtidos de pacientes matriculados no Hospital Universitário Professor Edgard Santos e que tiveram seu diagnóstico confirmado através de sorologia positiva para doença de Chagas e histórico clínico compatível com tal diagnóstico.

Os antígenos estudados, rH2A, proteína “Q” e KMP11 foram titulados nas seguintes concentrações 0.025 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml e 5 µg/ml. A melhor concentração que diferenciou os soros positivos dos negativos foi de 1 µg/ml de antígeno. Vale ressaltar que a concentração utilizada no presente estudo para antígenos recombinantes é a mesma que foi sugerida por Badaró e cols. (Badaro, Benson *et al.*, 1996) para ser aplicada no ELISA com antígenos recombinantes.

Foram realizadas dosagens através da técnica de ELISA para detecção de imunoglobulina da classe G. Foi feita uma curva dose-resposta com os soros para determinar qual a melhor concentração do soro em relação à resposta obtida com a concentração do antígeno. Para isso, os soros foram diluídos, 40, 50, 80, 100 e 160 vezes em PBS (tampão fosfato de sódio) 1X pH 7.2 com 0.05% de Tween 20. Cada um dos antígenos em estudo foi titulado para verificar a melhor concentração a ser utilizada para todo o estudo, conforme dito anteriormente.

A sensibilização das placas (Immulon 4; Dynatech Laboratories, Chantilly, Va) foi realizada adicionando 100 µl do antígeno (1µg/ml) por poço, diluído em tampão carbonato / bicarbonato pH9.6 e incubando overnight a 4º C. A seguir as placas foram submetidas a cinco lavagens com 200 µl/poço de PBS (tampão fosfato de sódio) 1X pH7.2 com 0,05% de Tween 20 e o bloqueio foi

realizado com 100µl/poço de PBS 1X pH7.2 com 1% de Tween 20 por 1 h à temperatura ambiente. Foram adicionados 100µl/poço dos soros testes e dos controles diluídos 1:50 em PBS 1X pH7.2 com 0,05% de Tween 20 e incubados por 1h à 37° C. As placas foram então lavadas 5 vezes com 200µl/poço de PBS 1X pH 7.2 com 0,05% de Tween 20 e posteriormente adicionado 100µl/poço do conjugado fosfatase alcalina (anti-human IgG) (Sigma Chemical Co. – St. Louis, Mo) diluído em PBS 1X com 0,05% de Tween 20 na diluição de 1:10.000 e incubadas por 1h à 37°C. Foram realizadas cinco lavagens com 200 µl/poço de PBS 1X com 0,05% de Tween 20 e adicionado 100µl/poço da solução de substrato *para*-nitrofenilfosfato (Sigma Chemical Co.) diluído em tampão carbonato pH 9.6 com MgCl₂ na concentração de 1 mg/ml e deixado em local escuro, por 30 min, a temperatura ambiente para desenvolvimento da reação de cor. Foi utilizado um aparelho leitor de ELISA (Labsystems Multiskan®) para leitura das absorbâncias num comprimento de onda de 405 nm e os resultados foram expressos em densidade óptica (DO).

O valor do cutoff para cada ELISA para IgG foi definido como a média da densidade óptica (OD) mais três desvios padrões dos valores obtidos com soro de indivíduos sadios + soro de indivíduos com doença de Chagas - grupo controle (cutoff = $X+3DP$). As proporções dos valores verdadeiramente positivos e negativos para cada teste entre pacientes e controles nos permitiram calcular a sensibilidade e a especificidade, respectivamente. O teste de Wilcoxon para amostras pareadas foi utilizado para a análise dos dados.

11.2 Anexo 2 – Metodologia Artigo 2:

- Cultura de células e dosagem de citocinas

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas de sangue venoso heparinizado através de gradiente de centrifugação com Fycoll-Hypaque. Depois de proceder lavagem 3 vezes com 0,9% de NaCl, as CMSP foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO BRL, NY) suplementado com 10% de soro AB humano, 100 IU/ml de penicilina e 100 µg/ml de streptomicina. As células foram ajustadas para 3×10^6 células/ml, colocadas em placas com 24 poços e estimuladas com SLA (1µg/ml), H2A (5µg/ml) e KMP11 (5 µg/ml). Algumas células foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* mais KMP11. As culturas foram incubadas por 72h a 37°C e 5% de CO₂. Sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C. Os níveis de IL-5, IL-10 e IFN-γ foram dosados através do método de ELISA sandwich. Os resultados foram expressos em pg/ml.

- Dosagem intracelular de citocinas:

PBMC foram analisadas de acordo com seus padrões de expressão de citocina intracelular como descrito previamente por Sornasse e colaboradores (60). As células foram contadas e ajustadas para a concentração de 2×10^5 células por poço, cultivadas em placas de 96 poços (fundo "U") na presença de 200 µl RPMI 1640, 10% de soro AB por 20 horas a 37°C e 5% de CO₂. Durante as 8 h finais de cultura, foi adicionada Brefeldina-A (1µg/ml), que tem a função de bloquear a secreção de proteínas pelo complexo de Golgi. Após marcação com anticorpos monoclonais FITC (anti-CD4, anti-CD8 ou anti CD-14) (Pharmingen), as células foram incubadas por 15 min a 4°C, lavadas com PBS

1X e fixadas com 200 μ l de PBS 1X 2% de formaldeído por 20 min a TA. As células então passaram por um processo de permeabilização com a solução de saponina e marcação, por 30 min a 4°C, com anticorpo monoclonal anti-IL-10 conjugado com PE (Pharmingen). Essas preparações foram lavadas e analisadas usando o FACScalibur®. Para a análise dos dados duas regiões foram criadas levando em relação os parâmetros de tamanho e granulosidade celular. A região R1 contendo somente linfócitos e blastos onde foi feita a análise de células CD4+ ou CD8+ produtoras de IL-10, e a região R2 contendo somente monócitos / macrófagos para análise de células CD14+ produtoras de IL-10.

-Análise estatística:

A análise estatística para os resultados das dosagens das citocinas foi realizada utilizando o teste de Mann Whitney.

11.3 Anexo 3 – Metodologia Artigo 3:

- Pacientes:

Vinte e dois pacientes com leishmaniose mucosa (LM) foram selecionados e pareados por idade (± 10 if >20 anos e ± 5 if <20 anos) com vinte e dois pacientes com leishmaniose cutânea (LC). Os pacientes foram recrutados no posto de saúde de Corte de Pedra, uma região de transmissão de *L. braziliensis* no sudeste da Bahia, Brasil. Este posto de saúde é centro de referência para casos de leishmaniose em 22 municípios. Cada ano, aproximadamente 20 casos de LM e 800 casos de LC são diagnosticados no posto de saúde. Critérios de inclusão incluindo o diagnóstico da LC e LM,

baseados na presença de características úlceras cutâneas ou lesões mucosas, respectivamente, a reação positiva ao teste cutâneo (>5 mm) para antígeno de *Leishmania*, assim como isolamento do parasito ou achados histopatológicos característicos destas doenças. Todos os pacientes foram avaliados antes da terapia. Os critérios de exclusão incluíram: idade abaixo de 5 anos e acima de 60 anos, mal nutrição, infecção por HIV, diabetes mellitus e gravidez. Indivíduos sadios (n = 6) com teste de hipersensibilidade tardia positivo para proteína purificada derivada de Mycobacteria (PPD positivo) foram usados como controle em alguns experimentos.

- Antígenos:

Antígeno solúvel de *L. braziliensis* (SLA) foi obtido de um isolado de paciente com LM preparado como previamente descrito⁶. A concentração de proteína foi mensurada no sobrenadante deste antígeno solúvel de leishmania (SLA). Em algumas culturas a proteína purificada derivada de tuberculina (PPD – CT68) (Connaught laboratories, Ontario, Canada) foi usada.

- Dosagem de Citocinas:

Devido ao número de células obtidas não ser suficiente para realizar todos os experimentos em todos os pacientes, amostras pareadas de células de pacientes com LC e com LM foram necessárias para cada experimento. Para a dosagem de citocinas, CMSP de pacientes com LC e com LM foram ajustadas para 3×10^6 células/ml, colocadas em placas de 24 poços, e estimuladas com SLA (10 µg/ml). Anticorpos monoclonais anti-IL-2 (clone 533421), anti-IL-12 p70 or anti-IL-15 (clone 34505.11), ou recombinante CTLA-4/FC Chimera (R&D

Systems, Minneapolis, MN) foram adicionadas ao estímulo com SLA, PPD ou sem estímulos. Devido ao fato da quantidade de células de pacientes não serem suficientes para realização de todos esses experimentos, números diferentes de pacientes foram avaliados para cada experimento. Os números de pacientes estão especificados em cada secção específica de cada experimento. Curva dose-resposta foram realizadas, e mostraram uma concentração ótima para os anticorpos monoclonais de 20 µg/ml, e concentração ótima para CTLA-4 recombinante de 5 µg/ml. As culturas foram incubadas por 72 horas a 37°C com 5% CO₂. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70 °C. Os níveis de IFN-γ foram mensurados através do teste de ELISA sandwich usando reagentes comerciais (Duoset, R&D Systems, Minneapolis, MN). Os resultados são expressos em pg/ml ou em média de percentagem de supressão de IFN-γ para os experimentos com neutralização de anticorpos (anti-IL-2, IL-12, IL-15) e de CTLA-4.

- Avaliação de Marcadores de Superfície Celular:

Marcação para marcadores de superfície foi realizada usando análise por citometria de fluxo (FACS) de acordo com publicação prévia². CMSP de 8 pacientes com LC e 8 com LM obtidas através de separação de sangue total com Ficoll e lavadas três vezes e adicionado meio RPMI 1640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) suplementado com 10% de soro AB Rh+ humano, (SIGMA Chemical Co. St. Louis, MO) 100 IU/ml de penicilina e 100 µg/L de estreptomicina. 2×10⁵ CMSP foram incubadas com fluorescein isothiocyanate (FITC) ou phycoerythrin (PE)- soluções de anticorpos para marcação por 20 min a 4°C. Após a marcação, essas preparações foram lavadas com 0.1% PBS,

ficadas com 200 µl de 2% formaldeído em PBS e mantido a 4°C antes da aquisição usando FACS - fluorescence-activated cell sorter (Becton Dickinson, Palo Alto, CA). Os anticorpos usados para marcação foram anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-CD40L, anti-CTLA-4, anti-CD69, anti-CD62L, anti-CD28 or anti-HLA-DR marcados com FITC e CD4, anti-CD8 and anti-CD14 marcados com PE (PharMingen, San Diego, CA, USA). Os isotipos de anticorpos controle foram IgG1 and IgG2a. Os dados do FACS foram baseados em duas regiões que são compostas por tamanho e granulosidade celular: R1, região a qual contém somente linfócitos e blastos; e R2, região que contém macrófagos.

- Análise Estatística:

Considerando que os valores não apresentaram a uma distribuição Gaussiana, o teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dados entre os pacientes com LC e os pacientes com LM. Análises pareadas foram realizadas com o teste de Wilcoxon matched-pairs.

11.4 Anexo 4 - Considerações Éticas:

Termos de consentimento informado foram obtidos de todos os pacientes e controles estudados e este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia.

12. Referências Bibliográficas

Almeida, R., A. D'oliveira, Jr., *et al.* Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous *Leishmaniasis*. J Infect Dis, v.180, n.5, Nov, p.1735-7. 1999.

Araujo, M. I., A. R. De Jesus, *et al.* Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. Eur J Immunol, v.26, n.6, Jun, p.1399-403. 1996.

Araujo, M. I., B. Hoppe, *et al.* Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. J Infect Dis, v.190, n.10, Nov 15, p.1797-803. 2004.

Artis, D., A. Villarino, *et al.* The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. J Immunol, v.173, n.9, Nov 1, p.5626-34. 2004.

Bacellar, O., A. D'oliveira, Jr., *et al.* IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral *Leishmaniasis*. Cytokine, v.12, n.8, Aug, p.1228-31. 2000.

Bacellar, O., H. Lessa, *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal *Leishmaniasis* patients. Infect Immun, v.70, n.12, Dec, p.6734-40. 2002.

Badaro, R., D. Benson, *et al.* rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral *Leishmaniasis*. J Infect Dis, v.173, n.3, Mar, p.758-61. 1996.

Badaro, R., T. C. Jones, *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral *Leishmaniasis*. J Infect Dis, v.154, n.6, Dec, p.1003-11. 1986.

_____. A prospective study of visceral *Leishmaniasis* in an endemic area of Brazil. J Infect Dis, v.154, n.4, Oct, p.639-49. 1986.

Bafica, A., F. Oliveira, *et al.* American cutaneous *Leishmaniasis* unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. Int J Dermatol, v.42, n.3, Mar, p.203-7. 2003.

Bamford, R. N., A. P. Battiata, *et al.* Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.7, Apr 2, p.2897-902. 1996.

Barral, A., J. M. Costa, *et al.* Polar and subpolar diffuse cutaneous *Leishmaniasis* in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. Int J Dermatol, v.34, n.7, Jul, p.474-9. 1995.

Barral, A., M. Teixeira, *et al.* Transforming growth factor-beta in human cutaneous *Leishmaniasis*. Am J Pathol, v.147, n.4, Oct, p.947-54. 1995.

Barral-Netto, M., A. Barral, *et al.* Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous *Leishmaniasis*. Parasite Immunol, v.17, n.1, Jan, p.21-8. 1995.

Basu, R., S. Bhaumik, *et al.* Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral *Leishmaniasis*. J Immunol, v.174, n.11, Jun 1, p.7160-71. 2005.

Berberich, C., G. Machado, *et al.* The expression of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific. Biochim Biophys Acta, v.1442, n.2-3, Nov 8, p.230-7. 1998.

Berberich, C., J. M. Requena, *et al.* Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. Exp Parasitol, v.85, n.1, Jan, p.105-8. 1997.

Bogdan, C., A. Gessner, *et al.* Cytokines in *Leishmaniasis*: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. Immunobiology, v.189, n.3-4, Nov, p.356-96. 1993.

Bogdan, C., Y. Vodovotz, *et al.* Macrophage deactivation by interleukin 10. J Exp Med, v.174, n.6, Dec 1, p.1549-55. 1991.

Burns, J. M., Jr., J. M. Scott, *et al.* Characterization of a membrane antigen of *Leishmania amazonensis* that stimulates human immune responses. J Immunol, v.146, n.2, Jan 15, p.742-8. 1991.

Carson, W. E., J. G. Giri, *et al.* Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. J Exp Med, v.180, n.4, Oct 1, p.1395-403. 1994.

Carson, W. E., M. E. Ross, *et al.* Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. J Clin Invest, v.96, n.6, Dec, p.2578-82. 1995.

Carvalho, E. M., B. S. Andrews, *et al.* Circulating immune complexes and rheumatoid factor in schistosomiasis and visceral *Leishmaniasis*. Am J Trop Med Hyg, v.32, n.1, Jan, p.61-8. 1983.

Carvalho, E. M., O. Bacellar, *et al.* Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral *Leishmaniasis*. J Immunol, v.152, n.12, Jun 15, p.5949-56. 1994.

Carvalho, E. M., R. Badaro, *et al.* Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral *Leishmaniasis*. J Clin Invest, v.76, n.6, Dec, p.2066-9. 1985.

Carvalho, E. M., A. Barral, *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous *Leishmaniasis*. Acta Trop, v.56, n.4, Apr, p.315-25. 1994.

_____. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. J Infect Dis, v.165, n.3, Mar, p.535-40. 1992.

Carvalho, E. M., D. Correia Filho, *et al.* Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous *Leishmaniasis*. Am J Trop Med Hyg, v.53, n.3, Sep, p.273-7. 1995.

Carvalho, E. M., W. D. Johnson, *et al.* Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal *Leishmaniasis*. J Immunol, v.135, n.6, Dec, p.4144-8. 1985.

Carvalho, E. M., R. S. Teixeira, *et al.* Cell-mediated immunity in American visceral *Leishmaniasis*: reversible immunosuppression during acute infection. Infect Immun, v.33, n.2, Aug, p.498-500. 1981.

Castes, M., A. Agnelli, *et al.* Characterization of the cellular immune response in American cutaneous *Leishmaniasis*. Clin Immunol Immunopathol, v.27, n.2, May, p.176-86. 1983.

Cherwinski, H. M., J. H. Schumacher, *et al.* Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. J Exp Med, v.166, n.5, Nov 1, p.1229-44. 1987.

Cooke, A., P. Tonks, *et al.* Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. Parasite Immunol, v.21, n.4, Apr, p.169-76. 1999.

Costa, C. H., H. F. Pereira, *et al.* [Visceral *Leishmaniasis* epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986]. Rev Saude Publica, v.24, n.5, Oct, p.361-72. 1990.

Costa, J. M., P. D. Marsden, *et al.* Disseminated cutaneous *Leishmaniasis* in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. J Trop Med Hyg, v.89, n.6, Dec, p.319-23. 1986.

Coutinho, S. G., M. P. Oliveira, *et al.* T-cell responsiveness of American cutaneous *Leishmaniasis* patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. Exp Parasitol, v.84, n.2, Nov, p.144-55. 1996.

Coutinho, S. G., C. Pirmez, *et al.* Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary *Leishmaniasis* patients. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.96 Suppl 1, Apr, p.S173-8. 2002.

Cunha, S., M. Freire, *et al.* Visceral *Leishmaniasis* in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.89, n.2, Mar-Apr, p.155-8. 1995.

De Andrade, T. M., R. Teixeira, *et al.* [Hypersensitivity of delayed type in visceral *Leishmaniasis*]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.24, n.5, Sep-Oct, p.298-302. 1982.

D'oliveira Junior, A., S. R. Costa, *et al.* Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral *Leishmaniasis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.92, n.1, Jan-Feb, p.15-20. 1997.

El Amin, E. M., E. P. Wright, *et al.* Characterization of the humoral immune response in Sudanese *Leishmaniasis*: specific antibody detected by class- and subclass-specific reagents. Clin Exp Immunol, v.64, n.1, Apr, p.14-9. 1986.

Evans, T. G., M. J. Teixeira, *et al.* Epidemiology of visceral *Leishmaniasis* in northeast Brazil. J Infect Dis, v.166, n.5, Nov, p.1124-32. 1992.

Farrar, J. J., J. Fuller-Farrar, *et al.* Thymoma production of T cell growth factor (Interleukin 2). J Immunol, v.125, n.6, Dec, p.2555-8. 1980.

Fiorentino, D. F., M. W. Bond, *et al.* Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med, v.170, n.6, Dec 1, p.2081-95. 1989.

- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, *et al.* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol, v.147, n.11, Dec 1, p.3815-22. 1991.
- Follador, I., C. Araujo, *et al.* Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. Clin Infect Dis, v.34, n.11, Jun 1, p.E54-8. 2002.
- Funasa. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana-Ministério da Saúde. 2000
- Galvao-Castro, B., J. A. Sa Ferreira, *et al.* Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral *Leishmaniasis*. Clin Exp Immunol, v.56, n.1, Apr, p.58-66. 1984.
- Gazzinelli, R. T., I. P. Oswald, *et al.* IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. J Immunol, v.148, n.6, Mar 15, p.1792-6. 1992.
- Ghalib, H. W., J. A. Whittle, *et al.* IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. J Immunol, v.154, n.9, May 1, p.4623-9. 1995.
- Ghosh, A. K., S. Dasgupta, *et al.* Immunoglobulin G subclass-specific anti*Leishmanial* antibody responses in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal *Leishmaniasis*. Clin Diagn Lab Immunol, v.2, n.3, May, p.291-6. 1995.
- Gontijo, B. e L. De Carvalho Mde. [American cutaneous *Leishmaniasis*]. Rev Soc Bras Med Trop, v.36, n.1, Jan-Feb, p.71-80. 2003.
- Gorak, P. M., C. R. Engwerda, *et al.* Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. Eur J Immunol, v.28, n.2, Feb, p.687-95. 1998.

Grabstein, K. H., J. Eisenman, *et al.* Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. Science, v.264, n.5161, May 13, p.965-8. 1994.

Grimaldi, G., Jr., R. B. Tesh, *et al.* A review of the geographic distribution and epidemiology of *Leishmaniasis* in the New World. Am J Trop Med Hyg, v.41, n.6, Dec, p.687-725. 1989.

Hamano, S., K. Himeno, *et al.* WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. Immunity, v.19, n.5, Nov, p.657-67. 2003.

Ho, J. L., R. Badaro, *et al.* Diminished in vitro production of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha during acute visceral *Leishmaniasis* and recovery after therapy. J Infect Dis, v.165, n.6, Jun, p.1094-102. 1992.

Holscher, C., A. Holscher, *et al.* The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. J Immunol, v.174, n.6, Mar 15, p.3534-44. 2005.

Hommel, M., W. Peters, *et al.* The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral *Leishmaniasis*. Ann Trop Med Parasitol, v.72, n.3, Jun, p.213-18. 1978.

Hunter, C. A., A. Villarino, *et al.* The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. Immunol Rev, v.202, Dec, p.106-14. 2004.

Jardim, A., V. Funk, *et al.* Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. Biochem J, v.305 (Pt 1), Jan 1, p.307-13. 1995.

Jardim, A., S. Hanson, *et al.* Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. Biochem J, v.305 (Pt 1), Jan 1, p.315-20. 1995.

Jeronimo, S. M., R. M. Oliveira, *et al.* An urban outbreak of visceral *Leishmaniasis* in Natal, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.88, n.4, Jul-Aug, p.386-8. 1994.

Kolls, J. K. e A. Linden. Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity, v.21, n.4, Oct, p.467-76. 2004.

Kopf, M., F. Brombacher, *et al.* IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. J Exp Med, v.184, n.3, Sep 1, p.1127-36. 1996.

La Flamme, A. C., K. Ruddenklau, *et al.* Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. Infect Immun, v.71, n.9, Sep, p.4996-5004. 2003.

Lehn, M., W. Y. Weiser, *et al.* IL-4 inhibits H₂O₂ production and anti*Leishmanial* capacity of human cultured monocytes mediated by IFN-gamma. J Immunol, v.143, n.9, Nov 1, p.3020-4. 1989.

Liew, F. Y., S. Millott, *et al.* Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T cells in *Leishmaniasis*. Eur J Immunol, v.19, n.7, Jul, p.1227-32. 1989.

Liew, F. Y. e C. A. O'donnell. Immunology of *Leishmaniasis*. Adv Parasitol, v.32, p.161-259. 1993.

Llanos Cuentas, E. A., C. C. Cuba, *et al.* Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.78, n.6, p.845-6. 1984.

Locksley, R. M., S. Pingel, *et al.* Susceptibility to infectious diseases: *Leishmania* as a paradigm. J Infect Dis, v.179 Suppl 2, Mar, p.S305-8. 1999.

Maalej, I. A., M. Chenik, *et al.* Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral *Leishmaniasis*. Am J Trop Med Hyg, v.68, n.3, Mar, p.312-20. 2003.

Medeiros, M., Jr., M. C. Almeida, *et al.* Low frequency of positive skin tests in asthmatic patients infected with *Schistosoma mansoni* exposed to high levels of mite allergens. Pediatr Allergy Immunol, v.15, n.2, Apr, p.142-7. 2004.

Melby, P. C., F. Andrade-Narvaez, *et al.* In situ expression of interleukin-10 and interleukin-12 in active human cutaneous *Leishmaniasis*. FEMS Immunol Med Microbiol, v.15, n.2-3, Sep, p.101-7. 1996.

Molano, I., M. G. Alonso, *et al.* A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. Vet Immunol Immunopathol, v.92, n.1-2, Mar 20, p.1-13. 2003.

Moll, H. The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. Adv Exp Med Biol, v.479, p.163-73. 2000.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol, v.136, n.7, Apr 1, p.2348-57. 1986.

Nathan, C. F., H. W. Murray, *et al.* Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J Exp Med, v.158, n.3, Sep 1, p.670-89. 1983.

Nieto, C. G., M. Garcia-Alonso, *et al.* Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental *Leishmaniasis*. Vet Immunol Immunopathol, v.67, n.2, Feb 1, p.117-30. 1999.

- Pauza, M. E., H. Neal, *et al.* T-cell production of an inducible interleukin-10 transgene provides limited protection from autoimmune diabetes. Diabetes, v.48, n.10, Oct, p.1948-53. 1999.
- Pflanz, S., L. Hibbert, *et al.* WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. J Immunol, v.172, n.4, Feb 15, p.2225-31. 2004.
- Pflanz, S., J. C. Timans, *et al.* IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. Immunity, v.16, n.6, Jun, p.779-90. 2002.
- Powrie, F., S. Menon, *et al.* Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. Eur J Immunol, v.23, n.11, Nov, p.3043-9. 1993.
- Reed, S. G. Diagnosis of *Leishmaniasis*. Clin Dermatol, v.14, n.5, Sep-Oct, p.471-8. 1996.
- Reed, S. G., R. Badaro, *et al.* Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. J Immunol, v.138, n.5, Mar 1, p.1596-601. 1987.
- Reed, S. G. e P. Scott. T-cell and cytokine responses in *Leishmaniasis*. Curr Opin Immunol, v.5, n.4, Aug, p.524-31. 1993.
- Reiner, S. L. e R. M. Locksley. The regulation of immunity to *Leishmania major*. Annu Rev Immunol, v.13, p.151-77. 1995.
- Requena, J. M., C. Alonso, *et al.* Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. Parasitol Today, v.16, n.6, Jun, p.246-50. 2000.
- Ribeiro-De-Jesus, A., R. P. Almeida, *et al.* Cytokine profile and pathology in human *Leishmaniasis*. Braz J Med Biol Res, v.31, n.1, Jan, p.143-8. 1998.

Robinson, D. S. e A. O'garra. Further checkpoints in Th1 development. Immunity, v.16, n.6, Jun, p.755-8. 2002.

Russo, D. M., J. M. Burns, Jr., *et al.* Human T cell responses to gp63, a surface antigen of *Leishmania*. J Immunol, v.147, n.10, Nov 15, p.3575-80. 1991.

Senaldi, G., H. Xiao-Su, *et al.* Serological diagnosis of visceral *Leishmaniasis* by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a *Leishmania donovani*-related circulating antigen. J Immunol Methods, v.193, n.1, Jun 14, p.9-15. 1996.

Sher, A., D. Fiorentino, *et al.* Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. J Immunol, v.147, n.8, Oct 15, p.2713-6. 1991.

Sher, A., R. T. Gazzinelli, *et al.* Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. Immunol Rev, v.127, Jun, p.183-204. 1992.

Shiddo, S. A., G. Hultdt, *et al.* Visceral *Leishmaniasis* in Somalia. Significance of IgG subclasses and of IgE response. Immunol Lett, v.50, n.1-2, Apr, p.87-93. 1996.

Silva, J. S., P. J. Morrissey, *et al.* Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med, v.175, n.1, Jan 1, p.169-74. 1992.

Skeiky, Y. A., J. A. Guderian, *et al.* A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. J Exp Med, v.181, n.4, Apr 1, p.1527-37. 1995.

Skeiky, Y. A., M. Kennedy, *et al.* LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. J Immunol, v.161, n.11, Dec 1, p.6171-9. 1998.

Smith, K. A. Interleukin 2. Annu Rev Immunol, v.2, p.319-33. 1984.

Soto, M., J. M. Requena, *et al.* Molecular characterization of a *Leishmania donovani* infantum antigen identified as histone H2A. Eur J Biochem, v.205, n.1, Apr 1, p.211-6. 1992.

_____. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral *Leishmaniasis*. J Clin Microbiol, v.36, n.1, Jan, p.58-63. 1998.

_____. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with *Leishmaniasis*. Immunol Lett, v.48, n.3, Dec, p.209-14. 1995.

Stuyt, R. J., S. H. Kim, *et al.* Regulation of Staphylococcus epidermidis-induced IFN-gamma in whole human blood: the role of endogenous IL-18, IL-12, IL-1, and TNF. Cytokine, v.21, n.2, Jan 21, p.65-73. 2003.

Titus, R. G., C. M. Theodos, *et al.* Interactions between *Leishmania major* and macrophages. Immunol Ser, v.60, p.437-59. 1994.

Trinchieri, G., S. Pflanz, *et al.* The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. Immunity, v.19, n.5, Nov, p.641-4. 2003.

Turetz, M. L., P. R. Machado, *et al.* Disseminated *Leishmaniasis*: a new and emerging form of *Leishmaniasis* observed in northeastern Brazil. J Infect Dis, v.186, n.12, Dec 15, p.1829-34. 2002.

Villarino, A., L. Hibbert, *et al.* The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. Immunity, v.19, n.5, Nov, p.645-55. 2003.

Walker, P. S., T. Scharon-Kersten, *et al.* Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of *Leishmaniasis*. Hum Gene Ther, v.9, n.13, Sep 1, p.1899-907. 1998.

Who, W. E. C.-. Control of the *Leishmaniasis*. WHO Tech Rep Ser, p.1-158. 1990

Who, W. H. O.-. *Leishmaniasis*. Tropical diseases Research. 1998

Yang, J. S., L. Y. Xu, *et al.* Adherent dendritic cells expressing high levels of interleukin-10 and low levels of interleukin-12 induce antigen-specific tolerance to experimental autoimmune encephalomyelitis. Immunology, v.101, n.3, Nov, p.397-403. 2000.

Yoshida, H., S. Hamano, *et al.* WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. Immunity, v.15, n.4, Oct, p.569-78. 2001.

Zijlstra, E. E., N. S. Daifalla, *et al.* rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. Clin Diagn Lab Immunol, v.5, n.5, Sep, p.717-20. 1998.

Zwingenberger, K., G. Harms, *et al.* Determinants of the immune response in visceral *Leishmaniasis*: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production. Clin Immunol Immunopathol, v.57, n.2, Nov, p.242-9. 1990.