UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

THAYS MIRANDA DE ALMEIDA

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR ATIVA

Recife

2013

THAYS MIRANDA DE ALMEIDA

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR ATIVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Orientador(a): Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

Co-orientador(a): Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Recife

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dr. Maria Eduarda Lacerda Larrazábal da Silva

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dr. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Almeida, Thays Miranda de
Perfil de expressão gênica de mediadores da resposta imune celular em pacientes com leishmaniose tegumentar ativa/Thays Miranda de Almeida– Recife: O Autor, 2013.

106 folhas : il., fig., tab.
Orientadora:Dra Valéria Rêgo Alves Pereira
Coorientadora:Dra Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2013.
Inclui bibliografia, apêndices e anexos

1. Leishmaniose 2. Imunologia 3. PCR (Bioquímica) I. Pereira, Valéria Rêgo Alves (orientadora) II. Castro, Maria Carolina Accioly Brelaz de (coorientadora) III. Título

616.9364 CDD (22.ed.) UFPE/CCB- 2013- 342

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Recife, 28 de agosto de 2013

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de agosto de 2013, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira (Departamento de Imunologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães)

Assinatura:_____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta (Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura:_____

TERCEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Milena de Paiva Cavalcanti (Departamento de Imunologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães)

Assinatura:_____

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado força e coragem para seguir em frente em todos os momentos;

A meus queridos e amados pais, Leonardo e Avani, que são a luz da minha vida! e a minhas amadas irmãs, Ellys e Lays, melhores amigas que Deus poderia me conceder, pelo amor, carinho, cuidado, companhia e puxões de orelha quando necessários!!;

A minha Orientadora, Professora Drª. Valéria, por ter aberto, gentilmente, as portas do laboratório para mim, por ter confiado no meu trabalho e pela AMIZADE que espero que dure muitos e muitos anos!

A minha Co-orientadora, Dr. Maria Carolina Brelaz (Carol), pelas orientações em relação a esse trabalho e também pelo carinho, conversas, conselhos, caronas e sobretudo pela AMIZADE que espero que dure muitos e muitos anos!

Aos membros da banca, Dr.Milena Paiva e Dr.Maíra Pitta pela disponibilidade em participar da banca examinadora na qualificação e na defesa da dissertação, fornecendo excelentes contribuições científicas a este trabalho;

A Marina Souza, pelo "batismo" na técnica PCR quantitativa em tempo real e pela disponibilidade em sempre esclarecer minhas dúvidas, além da AMIZADE e carinho;

A Amanda Almeida, colega de graduação, de laboratório e querida amiga, pela força, carinho e sobretudo pela AMIZADE que espero que dure muitos e muitos anos;

A Aline Silva e Thiago André (meu casalzinho do coração) pelo carinho, companhias na hora do almoço, ajudas na formatação deste trabalho e sobretudo pela AMIZADE que espero que dure muitos e muitos anos;

Aos demais membros do Laboratório de Imunogenética: Andresa Oliveira, Beatriz Coutinho, Lucas Rocha, Rafael Freitas, Renan Garcia, Laís Baracho, Sarah Lima, Rossana Santos e Amanda Brum pelos bons momentos e apoio no dia-a-dia.

A minha colega de turma e "super-amiga" Mariana Nunes, e a minha amiga Fernanda Araújo pela amizade, carinho, apoio e AMIZADE que espero que dure muitos e muitos anos;

A minhas eternas "chefas" e amigas Natália Morais e Thacianna Barreto, além da minha querida amiga Alice Bezerra e aos demais colegas do Laboratório de microbiologia do LIKA pelo carinho e amizade;

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães por fornecer a estrutura e todos os equipamentos que foram necessários para o desenvolvimento desse trabalho.

A pós-graduação em Inovação Terapêutica da UFPE pela oportunidade e apoio para o desenvolvimento da dissertação. Em especial ao secretário Paulo Germano e a professora Suely Galdino (in memoriam) pelo auxílio.

A CAPES e ao CNPq por financiar o estudo e a todos aqueles por ventura não mencionados aqui, mas que contribuíram de alguma maneira para esse trabalho, MUITO OBRIGADA!

“ Nada deve parecer impossível de mudar”
Bertolt Brecht

Almeida, T.M. **Perfil de expressão gênica de mediadores da resposta imune celular de pacientes com leishmaniose tegumentar ativa.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.

RESUMO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias e, no Brasil, a *Leishmania (V.) braziliensis* é a espécie de maior incidência para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Em todas as suas formas clínicas, a resposta imune é dependente de células T, por isso, torna-se importante compreender os mecanismos imunológicos responsáveis pela formação, progressão e cura da doença. O presente estudo teve como objetivo identificar, através da técnica PCR quantitativa em tempo real (qPCR), o perfil de expressão de mRNA para IFN-γ, TNF-α, TGF-β, IL-10 e IL-4 e da enzima iNOS em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com LTA após estimulação com os antígenos solúvel e insolúvel de *L.(V.) braziliensis*. Associou-se o perfil de expressão desses mediadores ao tamanho, tempo e número de lesões, além da resposta a intradermorreação de Montenegro (IDRM). Células de 27 pacientes e 6 controles foram incubadas por 24 horas na presença do mitógeno fitohemaglutinina (PHA) ou dos antígenos solúvel (AgSol) e insolúvel (AgIns) de *L. (V.) braziliensis*. A expressão de mRNA para as citocinas e para a iNOS foi avaliada por qPCR e as análises dos resultados foram feitas através do método Ct comparativo e pelos testes não-paramétricos Wilcoxon e Mann-Whitney. Em relação ao AgSol, foi verificada diferença significava da expressão de IFN-γ e TNF-α em pacientes quando comparados aos controles. Quanto ao AgIns, houve expressão significativa das citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-4 em pacientes quando comparados aos controles. As citocinas IL-10 e TGF- β foram expressas frente a todos os estímulos utilizados, não apresentando diferença significativa entre e intra-grupos. Não houve expressão de iNOS com nenhum dos estímulos utilizados. Comparando os antígenos de *L.(V.) braziliensis* utilizados, foi observado maior expressão de IFN-γ e TNF-α frente ao antígeno insolúvel do parasita. A partir desses dados, podemos sugerir que ambas frações antigênicas do parasita são capazes de induzir uma resposta imune específica em pacientes com LTA ativa. Além disso, os dados obtidos nesse estudo sugerem a existência de um perfil de resposta imune Th1 para o antígeno solúvel e um perfil de resposta imune Th1 e Th2 considerando o antígeno insolúvel do parasita. A expressão gênica significativa para as citocinas TNF-α e IFN-γ, sugere que os pacientes tenham montado uma eficiente resposta imune contra o parasita e a presença da citocina IL-10 que eles estariam promovendo um mecanismo imunorregulatório sobre a forte resposta imune inflamatória exercida pelas citocinas Th1. Dentre os antígenos utilizados, pode-se sugerir que, devido a sua composição, o antígeno insolúvel seja mais imunogênico que o antígeno solúvel e que, por isso, essa molécula antigênica seja uma possível candidata a vacina e alvos para a imunoterapia. A ausência de expressão da iNOS pode ter sido devido a presença de TGF-β, que estaria regulando negativamente a produção de NO e consequentemente de iNOS. Além disso, pode estar havendo um mecanismo auto-regulatório para evitar produção em excesso de NO. A existência do perfil Th1 e Th2 pode ser explicado pelo estágio de desenvolvimento da doença. Assim, pelo fato de a LTA apresentar uma resposta Th1 multifacetada torna-se necessário estudos complementares para verificar o papel de outros tipos celulares e citocinas na progressão e cura da doença.

Palavras–chave: Resposta imune celular, Leishmaniose tegumentar americana, qPCR

Almeida, T.M. **Gene expression profile of cellular immune response mediators in patients with active cutaneous leishmaniasis.** (Dissertation). Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, in 2013.

ABSTRACT

Leishmaniasis are infectious and parasitic diseases and, in Brazil, *Leishmania (V.) braziliensis* is the specie with the highest incidence for American Cutaneous Leishmaniasis (ACL). In all its clinical forms, the immune response is dependent on T cell, thus, it is very important to understand the immunological mechanisms responsible for the formation, progression and cure of the disease. This study aimed to identify through real time quantitative PCR (qPCR), the mRNA expression profile for IFN-γ, TNF-α, TGF- β, IL-10, IL-4 and the iNOS enzyme in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of ACL patients after stimulation with the soluble and insoluble antigens of *L.(V.)braziliensis.* We associated the expression profile of these mediators with size, time and number of lesions and also with the response to the Montenegro skin test (MST). Cells from 27 patients and 6 controls were incubated for 24 hours in the presence of the mitogen phytohemagglutinin (PHA) or *L.(V.) braziliensis* soluble (AgSol) or insoluble (AgIns) antigens. The mRNA expression for the cytokines and iNOS were evaluated by qPCR and analyses of results were obtained through the comparative Ct method and Wilcoxon and the Mann-Whitney non-parametric tests. In response to the AgSol, it was verified IFN-γ and TNF-α significant expression in patients in comparasion to controls. In response to AgIns, there were significant IFN-γ, TNF-α and IL-4 expression in patients in comparasion to controls. The cytokine IL-10 and TGF-β were expressed against all stimuli used, with no significant difference between or within groups. No expression of iNOS was observed in in any of the stimuli used. Comparing among the *L.(V.)braziliensis* antigens used, we observed an higher expression of IFN-γ and TNF-α against the parasite AgIns. From these data, we can suggest that both antigenic fractions of the parasite are capable of inducing a specific immune response from patients with active ACL. Furthermore, the data obtained in this study suggest the existence of a Th1 immune response profile for AgSol and a Th1 and Th2 immune profile considering the parasite insoluble antigen. The significant gene expression for TNF-α and IFN-γ suggests that patients have mounted an effective immune response against the parasite and the expression of the cytokine IL-10 that they would be promoting an immunoregulatory mechanism stopping the strong inflammatory immune response exerced by Th1 cytokines. Among the antigens used, we may suggest that due to its composition, the insoluble antigen may be more immunogenic than than soluble antigen and, therefore, this antigenic molecule may be a potential vaccine candidate and target for immunotherapy. The absence of iNOS expression may have been due to the presence of TGF-β, which would negatively regulate NO production and hence iNOS. In addition, there may be a self-regulatory mechanism to prevent an excess in the production of NO. The existence of the Th1 and Th2 cprofile can be explained by disease development stage. Therefore, due to the fact that ACL presents a multifaceted Th1 response it is necessary complementary studies to verify the role of other cell types and cytokines in the progression and cure of this disease.

Keywords: cellular immune response, American cutaneous leishmaniasis, qPCR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Casos de LTA e percentual, segundo região de residência. Brasil, 2000 a 2008 20

Figura 2: Formas evolutivas de *L. (V.) braziliensis*, em que (A) apresenta a forma promastigota do parasita em meio extracelular e (B) sua forma amastigota no interior de macrófagos. 23

Figura 3: Ciclo biológico da *Leishmania spp*..... 24

Figura 4: Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana..... 28

Figura 5 :Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana 32

Figura 6: Esquema demostrando a resposta imune na LTA..... 41

Figura 7: Expressão gênica para IFN-γ, TNF-α, TGF-β, IL-10, IL-4 por PBMC de pacientes com LTA ativa em comparação com o grupo controle frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis*. 54

Figura 8: Comparação da expressão gênica para IFN-γ, TNF-α, TGF-β, IL-10, IL-4 em PBMC de pacientes com LTA ativa frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.).braziliensis*..... 55

Figura 9:Correlação entre a expressão gênica de citocinas do perfil Th1 e Th2 em pacientes com LTA ativa: A (TNF-α x IL-10); B (TNF-α x IL-4), D (IL-10 x IL-4), E (TGF-β x IFN-γ) e F (TGF-β x TNF-α) frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis* 57

Figura 10: Correlação entre os dados clínicos de pacientes e a expressão de citocinas do perfil Th1 : A (IDRM x Tempo de lesão em meses), B (IDRM x IFN-γ) e C (IL-4 x tempo de lesão) de pacientes com LTA ativa..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ensaios experimentais realizados nesta pesquisa. 48

Tabela 2 - Dados de pacientes com LTA ativa atendidos no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- CPqAM- FIOCRUZ, no período de 2008-2010 quanto a idade, sexo, localidade de origem, número de lesões, forma clínica, local da lesão, tempo de evolução e tamanho das lesões. 50

Tabela 3 - Resultado dos testes laboratorias realizados em pacientes com Leishmaniose tegumentar ativa em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmanioses atendidos no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- CPqAM- FIOCRUZ, no período de 2008-2010. 52

Tabela 4 - Valores de expressão referente ao mRNA de citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-10, TGF-β e IL-4 de pacientes com LTA ativa comparados ao grupo controle (RQ1) e comparação da expressão das citocinas citadas no grupo de pacientes frente aos antígenos solúvel e insoluvel *de L(V.)braziliensis* 56

Tabela 5 - Correlação entre a expressão gênica de citocinas do perfil Th1 e Th2 (IFN-γ x IL-10, TNF-α x IL-10, IFN- γ x IL-4, TNF-α x IL-4, TNF-α x IFN-γ, IL-10 x IL-4 de pacientes com LTA ativa frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis* 58

Tabela 6: Correlação entre os dados clínicos dos pacientes com LTA ativa e entre os dados clínicos e a expressão gênica de citocinas do perfil Th1 (TNF-α e IFN-γ): IDRM x tempo de lesão; IDRM x tamanho de lesão; IDRM x número de lesões; IDRM x IFN- γ e IDRM x TNF-α. frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis*.....59

Tabela 7 - Correlação entre a expressão gênica das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-10 e IL-4 e dos dados clínicos dos pacientes com LTA: tempo e tamanho de lesões frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis*.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(L.)	*Leishmania*
(V.)	*Viannia*
AgIns	Antígeno insolúvel de formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis*
AgSol	Ántigeno solúvel de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*
CT	Controles
Ct	*Threshold Cycle*
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	*Ensaio imunoenzimático*
FAM	6-Carboxifluoroceína
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LTA	Leishmaniose tegumentar Americana
MGB	minor groove binding
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
NFQ	Quencher que não emite fluorescência
NK	*Natural Killer*
NNN	McNeal, Novy & Nicole
NO	Óxido Nítrico
NTC	Non template control/Controle Negativo
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Fitohemaglutinina
PMSF	Metil-fenil-fluoreto
qPCR	PCR em tempo real quantitativa
RNA	Ácido Ribonucléico
ROX	6-Carboxi-x-rodamina
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SBF	Soro bovino fetal
Sbv	Antimonial Pentavalente
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SRL	Serviço de Referência em Leishmanioses
T CD4+	Linfócito T CD4+
T CD8+	Linfócito T CD8+

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator beta de crescimento e transformação
Th	Linfócito T auxiliar
TGF-β	Fator beta de crescimento e transformação
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Th	Linfócito T auxiliar
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2.1. Geral 18
2.2. Específicos 18
3. REVISÃO DA LITERATURA 19
3.1. Epidemiologia 19
3.2. Parasita e ciclo biológico 21
3.3. Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana 25
3.4. Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana 29
3.5. Tratamento e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana 32
3.6. Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana 36
4. METODOLOGIA 42
4.1. Considerações Éticas 42
4.2. Tipo de Estudo e Amostragem 42
4.3. População de estudo 42
4.4. Exames laboratoriais para avaliação dos pacientes 43
4.5. Obtenção das frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis* 43
4.6. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) 44
4.7. Cultura de células mononucleares do sangue periférico 44
4.8. Obtenção de RNA a partir de PBMC 45
4.9. Ensaio de transcrição reversa 46
4.10. Avaliação da expressão gênica para citocinas 46
4.11. Correlação entre a expressão das citocinas e os dados clínicos dos pacientes 47
4.12. Análise estatística 48
5. RESULTADOS 49
5.1. Dados da população de estudo 49
5.2. Expressão gênica para os mediadores imunológicos Th1, Th2 e a citocina TGF-β em pacientes com LTA ativa 53
5.3. Comparação da expressão gênica para os mediadores imunológicos do perfil Th1, Th2 e para a citocina TGF-β em pacientes com LTA ativa 54
5.4. Correlação entre a expressão gênica das citocinas o perfil Th1, Th2 e para a citocina TGF-β em pacientes com LTA ativa frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis* 56
5.5. Correlação entre os dados clínicos dos pacientes e a expressão de citocinas do perfil Th1 e Th258
6. DISCUSSÃO 62
7. CONCLUSÕES 76
8. PERSPECTIVAS 77
9. REFERÊNCIAS 78
Apêndice A 86
Apêndice B 87
Apêndice C 88
Apêndice D 104
Anexo A 105
Anexo B 106

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é um complexo de doenças causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. Essa doença é endêmica em aproximadamente 98 países tropicais e subtropicais distribuídos na África, Ásia, Europa e América Latina (ALVAR et al.,2012; AMEEN, 2010). Em diferentes formas clínicas, a leishmaniose afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas em todo o mundo, apresentando uma incidência anual de 1,5-2 milhões de novos casos diagnosticados e 350 milhões de pessoas sob o risco de contrair a doença (AMEEN, 2010; CASTELLANO et al., 2009; KEDZIERSKI, 2010; SINGH; SHARMA, 2009). No Brasil, a *Leishmania (V.) braziliensis* é a principal espécie causadora da LTA (ANDRADE et al., 2009; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; BRITO et al., 2009).

A infecção experimental por *L. major* em camundongos tem sido utilizada para examinar aspectos da relação parasito-hospedeiro na leishmaniose, como o controle genético de susceptibilidade e resistência, o papel da resposta imune mediada por células e a interação parasito-macrófago (REIS et al., 2006; REITINGER et al., 2007). No entanto, poucos trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de avaliar a resposta imune celular na infecção experimental por *L. (V.) braziliensis*. Isso ocorre devido à dificuldade de crescimento *in vitro* desta espécie, a ineficiente conversão a formas infectantes e a resistência natural de muitas linhagens de camundongos frente à infecção, sendo necessária uma grande carga parasitária para realizá-la (MOURA et al., 2005). Portanto, a dificuldade em estabelecer modelos animais adequados para se estudar a *L. (V.) braziliensis*, assim como a dificuldade em extrapolar e interpretar resultados obtidos em modelos animais para humanos, dada às diferentes complexidades dos sistemas, contribuiu para o surgimento de estudos com pacientes (GOLLOB et al., 2008; REIS et al., 2006).

A caraterística genética, o status imunológico do hospedeiro e a espécie do parasita apresentam um importante papel em determinar a resistência ou susceptibilidade do hospedeiro as manifestações clínicas da doença (CASTELLANO et al., 2009; CUMMINGS, 2009). Os linfócitos T desempenham um papel fundamental na formação da resposta imune do hospedeiro através da secreção de citocinas, que pode atuar tanto de forma sinérgica como antagônica (CUMMINGS , 2010; SHARMA; SINGH, 2009; SOUZA et al., 2013). Os linfócitos T são decisivos para cura e geração de uma resposta imune protetora ao mesmo tempo em que são responsáveis pela persistência da doença e a sua patologia (CHOI; KROPF, 2009).

Na leishmaniose humana, o padrão de resposta imune do tipo 1 com produção de IFN-γ, TNF-α e IL-12, tem sido associado com o controle da infecção por ativação macrofágica e destruição parasitária (AMEEN, 2010; ROBERTS, 2006). A citocina IFN-γ atua em sinergia com TNF-α ativando óxido nítrico sintase (iNOS ou NOS2) a produzir óxido nítrico (NO), resultando na morte intracelular do parasita e controle da doença (BOGDAN et al., 2000; NYLEEN; GAUTAM, 2010). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10, consideradas do tipo 2, e a citocina TGF-β, perfil Th3, favorecem a multiplicação parasitária, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN-γ (GOMES-SILVA et al., 2007). Essas citocinas também são capazes de inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1 e sua consequente produção de IFN-γ e TNF-α (BARATTA-MASINI et al., 2007).

Apesar de válido em vários aspectos, o paradigma Th1/Th2 é um modelo simplificado, que precisa de revisão, dado que hoje em dia existem outros subtipos de células T, como células T regulatórias e células Th17 que também parecem apresentar papel importante na susceptibilidade e resistência a LTA (GOLLOB et al., 2008; KEDZIERSKI, 2010; NYLÉN; GAUTAM, 2010).

A transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica utilizada nesse estudo, é o método de escolha utilizado para analisar a expressão de mRNA em vários tecidos. A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma técnica que permite quantificar raros transcritos e observar pequenas mudanças na expressão gênica sendo de fácil execução além de fornecer resultados rápidos, precisos e confiáveis (PFAFFL,2001). Estudos mostram a aplicação dessa técnica para quantificação da expressão de mRNA de citocinas como um parâmetro para observar a ativação da resposta imune celular (HARTER, 2001). No entanto, poucos estudos têm analisado a expressão de mRNA para citocinas na leishmaniose humana (CACERES-DITMAR et al.,1993; ETTINGER, 2008).

Atualmente, as pesquisas buscam identificar marcadores imunológicos que permitam compreender os processos que levam a formação da lesão na LTA, como também os mecanismos responsáveis pela resistência e cura da doença. Assim, devido ao surgimento do perfil Th3, perfil Th17 e as células T regulatórias há a necessidade de reavaliar a importância do perfil Th1 e Th2 frente à infecção por *Leishmania (V.) braziliensis*. Além disso, embora existam vários estudos sobre os perfis Th1 e Th2, não existe um padrão de resposta imune estabelecido frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. Com isso, a investigação imunológica realizada, poderá fornecer subsídios importantes sobre o desenvolvimento da doença quanto aos seus aspectos clínicos, imunológicos e moleculares.

Além disso, a comparação da capacidade dos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* em obter uma resposta imune específica de células de pacientes com leishmaniose tegumentar ativa pode contribuir para pesquisas de moléculas imunogênicas do parasita que serão relevantes para a identificação de novos candidatos a subunidades de vacinas e alvos para imunoterapia. Dessa forma, esse estudo tem perspectivas e trará grandes benefícios para estudos futuros no campo do diagnóstico, da imunoterapia, da quimioterapia e da vacinação.

Portanto, o presente projeto teve como proposta identificar o perfil de expressão de mRNA para as citocinas IFN-γ, IL-10, IL-4, TGF-β, TNF-α e para a enzima iNOS, através da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar ativa, realizando-se a estimulação com os antígenos solúvel e insolúvel de *L.* (*V.*) *braziliensis.* Posteriormente associou-se a expressão desses mediadores aos dados clínicos como tempo de desenvolvimento, tamanho, número de lesões, bem como resposta a Intradermorreação de Montenegro (IDRM).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Determinar, através de abordagem molecular, o perfil da resposta imune em pacientes portadores de leishmaniose tegumentar ativa.

2.2. Específicos

a) Estudar a população quanto aos aspectos clínicos e epidemiológicos*;*

b) Identificar o perfil de expressão gênica para as citocinas IFN-γ, TNF-α; IL-10, IL-4, TGF-β e a enzima iNOS em PBMC de pacientes com LTA ativa, sob estímulo *in vitro* com antígenos solúvel e insolúvel de *L.(V).braziliensis;*

c) Correlacionar o tempo, o tamanho e o número de lesões e a resposta a IDRM com a expressão gênica para os mediadores imunológicos acima citados;

d) Determinar, na população em estudo, qual a fração antigênica apresenta maior imunogenicidade*;*

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Epidemiologia

As leishmanioses representam um grupo de doenças tropicais negligenciadas causada por protozoários do gênero *Leishmania* (SOONG, 2012). Considerada um grave problema de saúde pública, observou-se um aumento de sua incidência nos últimos anos. Esse aumento pode ser atribuído a muitos fatores como: epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV), mudanças ecológicas e no habitat do vetor causada por desflorestamento, urbanização, migração, conflitos armados, aumento de viagens internacionais, medidas inadequadas ou insuficientes de controle dos vetores e reservatórios, resistência a drogas leshmanicidas (AMEEN, 2010; CROFT, SUNDAR, 2006; DUTHIE, 2012; MONZOTE,2009; OMS, 2012; REITHINGER et al., 2007).

Em relação à leishmaniose cutânea, estima-se uma prevalência de 10 milhões de casos e uma incidência anual de 0.7 a 1.2 milhões de casos por ano em todo o mundo (ALVAR et al., 2012; OMS, 2010). Essa doença apresenta ampla distribuição mundial e cerca de 1/3 dos casos ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e na Ásia. Estima-se que o maior número de casos ocorre em dez países: Afeganistão, Argélia, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica, Peru, Colômbia e Brasil representando juntos uma incidência estimada em 70 a 75% os casos (ALVAR et al., 2012; GOTO; LINDOSO, 2010; SINGH; SHARMA, 2009). A leishmaniose tem sido classificada como uma doença negligenciada ocupando o segundo lugar em mortalidade e o quarto em morbidade entre as infecções tropicais (KEDIZIERSKI, 2010) No entanto, como muitas infecções não apresentam sintomas ou são mal diagnosticadas, a carga global da leishmaniose tegumentar é provavelmente subestimada (GONZALEZ et al., 2009; REITHINGER et al., 2007).

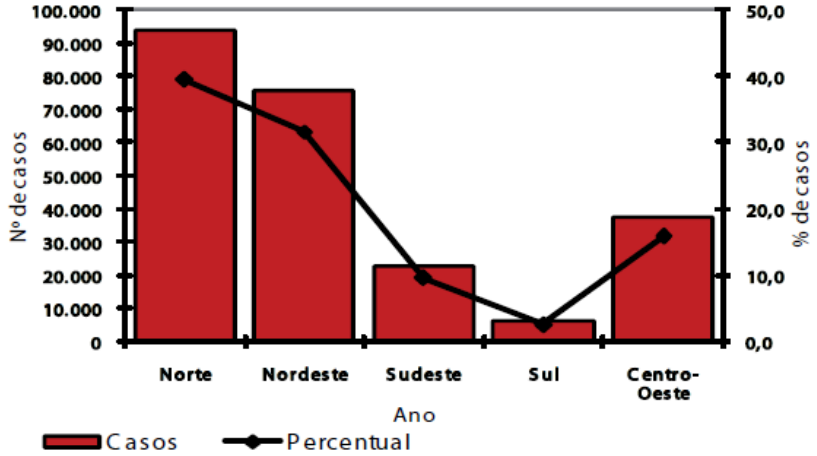
Segundo a Organização Mundial de saúde (OMS), a LTA é considerada uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (BRASIL, 2010). Apesar dessas características relevantes, a leishmaniose é considerada uma doença negligenciada apresentando notificação obrigatória em apenas 32 países, entre eles o Brasil (CLEM, 2010).

Nas Américas, considerada uma das doenças infecciosas de maior relevância, a LTA apresenta ampla distribuição existindo registros de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina com exceção do Chile e Uruguai (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

No Brasil, a doença está amplamente distribuída, com casos autóctones em todas as regiões e unidades federadas (BRASIL, 2010). De acordo com o Ministério da Saúde, de 2000 a 2008 foram registrados 238.749 casos de LTA no país, com média anual de 26.528 casos novos. As regiões Norte e Nordeste vêm contribuindo, ao longo dos anos, com os maiores percentuais de casos do país, de modo que, do total confirmado no período de 2000 a 2008, 39,4% (94.169/238.749) ocorreram na região Norte; 31,7% (75.657/238.749), na região Nordeste; 15,9% (37.853/238.749), na região Centro-Oeste; 9,6% (22.903/238.749), no Sudeste; e 2,6% (6.161/238.749), na região Sul (BRASIL, 2010) (Figura 1).

Em Pernambuco, observa-se uma incidência em todas as regiões do Estado, com predominância (mais de 60% de casos) na região correspondente a Zona da Mata Atlântica, sendo a quase totalidade na forma cutânea localizada (ANDRADE et al., 2009). Entre os anos de 2001 a 2010, foram reportados 4.855 casos de LTA em Pernambuco, com uma média de 485 casos/ano (BRITO et al., 2012).

Figura 1: Casos de LTA e percentual, segundo região de residência. Brasil, 2000 a 2008



Fonte: SINAN/SVS/MS.

3.2. Parasita e ciclo biológico

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença não contagiosa, de evolução crônica, que acomete as estruturas da pele e cartilaginosas da nasofaringe, de forma localizada, disseminada ou difusa, causada por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatide e do gênero *Leishmania* (BASANO; CAMARGO, 2004)

Embora existam mais de 20 espécies de protozoários responsáveis pela doença em humanos, nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermotrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas, somente em animais. No Brasil, já foram identificadas sete espécies, sendo seis do sub-gênero *Viannia* e uma do sub-gênero *Leishmania*. Os sub-gêneros *Leishmania (L.)* e *Viannia (V.)* apresentam diferenças quanto a localização das formas promastigotas: no sub-gênero *Leishmania,* as formas promastigotas multiplicam-se nas regiões média e anterior do intestino do flebótomíneo enquanto que o sub-gênero *Viannia*, as formas promastigotas migram para as regiões anterior, média e posterior do intestino, colonizando o vetor (LAINSON; SHAW, 1998). As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberge*, *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (AMEEN, 2010; BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010; GONTIJO & CARVALHO, 2003) Em Pernambuco, foram isoladas cepas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) shawi* (BRITO et al., 2009).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema mononuclear fagocítico, que apresentam durante o seu ciclo evolutivo dois estágios morfológica e bioquimicamente distintos: as formas promastigotas e as formas amastigotas (Figura 2) (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

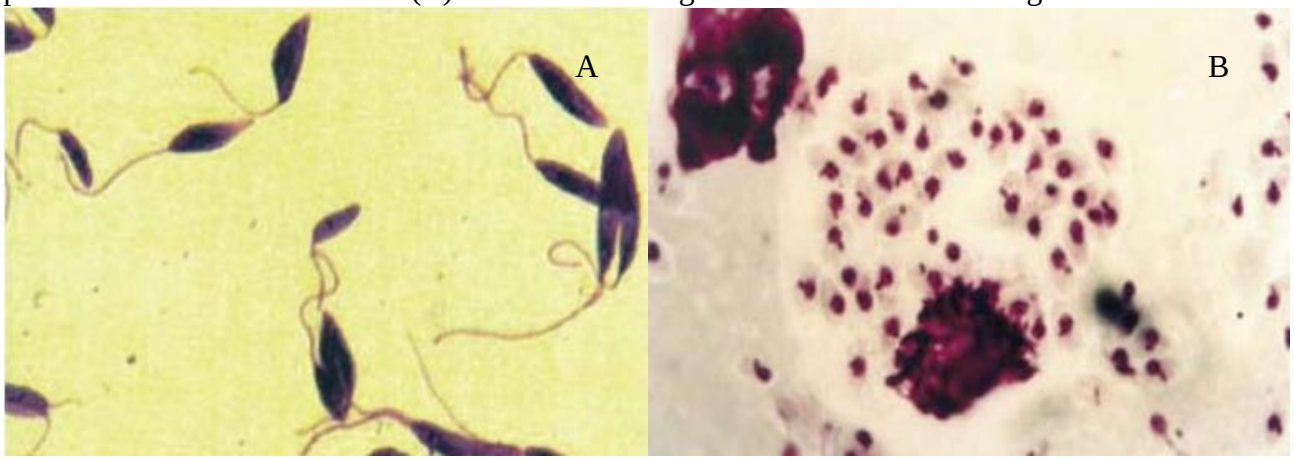
Esse parasita apresenta o ciclo de vida denominado heteroxênio, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, esse último sendo responsáveis pela transmissão de um mamífero a outro (GONTIJO; CARVALHO, 2003). As formas promastigotas caracterizam-se por serem alongadas e apresentarem flagelo bem desenvolvido, sendo encontradas no tubo digestivo do inseto vetor. As formas amastigotas são formas ovaladas ou arredondadas, sem flagelos que se multiplicam obrigatoriamente dentro de

células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro vertebrado alojam-se nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos. Nessas células do hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas vivem, e reproduzem-se de forma assexuada por divisão binária até romperem a célula, disseminando-se pelas vias hematogênica e linfática (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010).

Os vetores da LTA são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, e pertencentes ao gênero *Phlebotomus spp* encontrados no velho mundo ou ao gênero *Lutzomiya spp* encontrados no novo mundo (GONTIJO; CARVALHO, 2003; REITHINGER et al., 2007). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata, L. whitmani, L. umbratilis, L. intermedia, L. wellcome e, L. migonei.* (BRASIL, 2010).

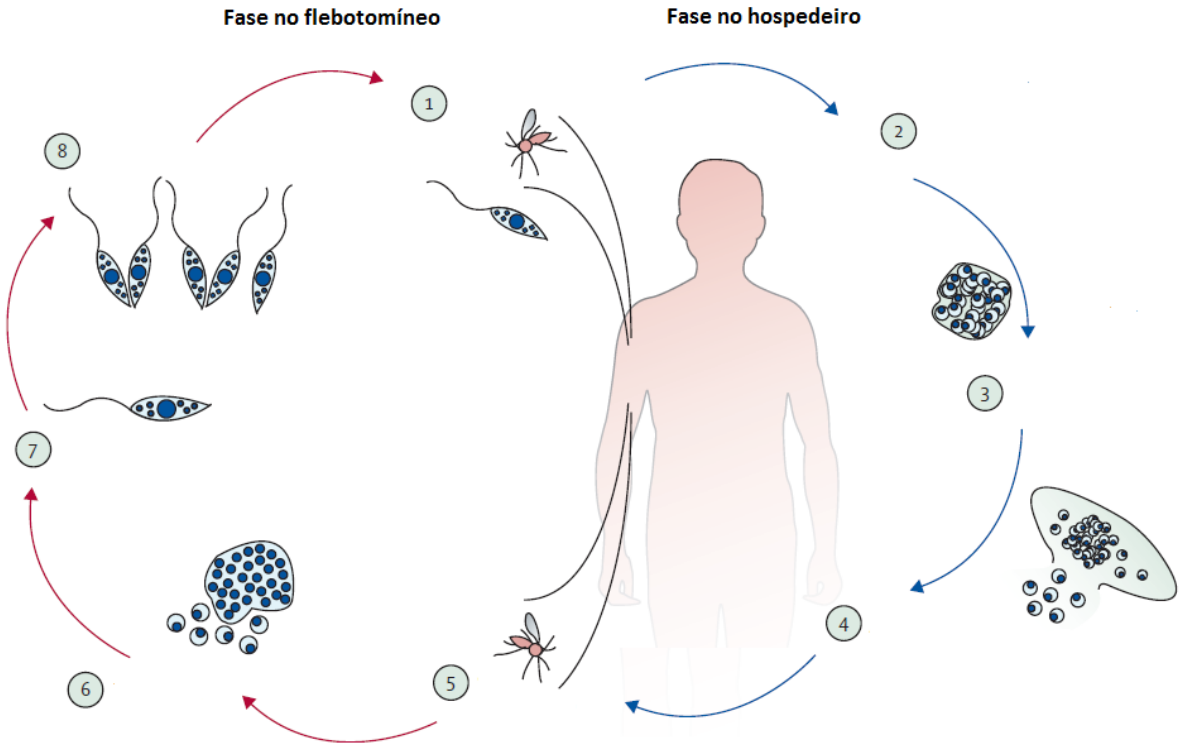
A transmissão da LTA inicia-se no momento do repasto sanguíneo quando a fêmea do flebotomíneo pica o hospedeiro vertebrado infectado e ingere células fagocíticas parasitadas com as formas amastigotas contidas no tecido do hospedeiro vertebrado. No intestino do inseto vetor, essas células se rompem e as formas amastigotas liberadas se diferenciam em formas promastigotas. No intestino dos insetos vetores, as formas promastigotas passam por metaciclogênese e deixam de se reproduzir, tornando-se infectantes (promastigotas metacíclicas). Essas formas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície e perdem a sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebotomíneo. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se, migrando para a faringe e cavidade bucal do inseto vetor, sendo transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo. Nesse repasto sanguíneo, a fêmea infectada regurgita as formas promastigotas metacíclicas, juntamente com a sua saliva, dentro da pele do hospedeiro vertebrado, e essas formas rapidamente infectam as células do sistema fagocítico mononuclear, diferenciando-se em formas amastigotas. As formas amastigotas sobrevivem e se replicam por divisão binária no ambiente ácido do fagolisossomo e, à medida que isso acontece, as células infectadas são lisadas liberando as formas amastigotas para parasitar novas células e poderem ser novamente ingeridas pelo vetor, completando o ciclo (Figura 2). As formas promastigotas também são encontradas em culturas axênicas, representando as formas em fase de crescimento logarítimo e em fase estacionária de crescimento, respectivamente (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010).

Figura 2: Formas evolutivas de *L. (V.) braziliensis*, em que (A) apresenta a forma promastigota do parasita em meio extracelular e (B) sua forma amastigota no interior de macrófagos.



Fonte: BRASIL, 2010

Figura 3: Ciclo biológico da *Leishmania spp*.



Fonte: Adaptado de REITHINGER et al., 2007

Legenda:

1. Ao picar o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos fêmeas infectados inoculam a forma promastigota na pele do hospedeiro vertebrado;
2. As formas promastigotas invadem ou são fagocitadas por células do hospedeiro vertebrado existentes no local ou recrutadas, principalmente macrógafos;
3. Dentro dos fagossomos dos macrófagos residentes, os promastigotas se transformam em amastigotas;
4. As formas amastigotas se replicam nas células fagocitárias (principalmente macrófagos) podendo levar a ruptura das mesmas e a infecção de outras células fagocitárias locais ou em tecidos distantes após a infecção;
5. Flebotomíneos fêmeas realizam repasto sanguíneo em hospedeiros infectados;
6. Flebotomíneos são infectados ao ingerir as forma amastigotas;
7. No intestino do flebotomíneos as formas amastigotas se transformam em formas promastigotas (dependendo da espécies de *Leishmania spp* diferentes regiões do intestino do plebotomíneo podem ser infectadas);
8. Os promastigotas se dividem e se transformam na forma metacíclica infectante, migrando para a probóscita do flebotomíneo;
9. O ciclo da *Leishmania* é reiniciado.

3.3. Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

As formas clínicas da LTA dependem de fatores do parasita, do vetor e das características epidemiológicas, além da constituição genética e imunológica do hospedeiro (CHOI; CROFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010). A infecção pode ser assintomática ou apresentar um espectro que varia desde lesões cutâneas localizadas ou disseminadas, forma cutânea difusa, até graves lesões mucocutâneas (GOLLOB et al., 2008; REIS et al., 2006). As manifestações clínicas estão geralmente associadas a uma espécie de *Leishmania*, embora algumas espécies possam causar diferentes formas clínicas (REIS et al., 2006; REITHINGER et al., 2007).

A leishmaniose cutânea (LC), manifestação clínica mais frequente, é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes. As lesões podem variar de 1 a 10 e geralmente aparecem em áreas expostas do corpo. No entanto, podem ocorrer múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação hematogênica levando a um número elevado de lesões caracterizando a leishmaniose cutânea disseminada (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010).

A LC surge após um período de incubação variável de 10 dias a três meses. A infecção cutânea pode permanecer subclínica ou no local da picada do inseto surge uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo podendo ser acompanhada de adenopatia regional, com ou sem linfangite. As lesões apresentam aspectos variados e a infecção secundária bacteriana altera estes aspectos tornando-as mais inflamadas, dolorosas e purulentas (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Na LC, são frequentes as ulcerações com bordas elevadas, enduradas e fundo com tecido de granulação grosseira, configurando a clássica lesão com borda em moldura. O quadro é normalmente assintomático podendo evoluir para cura espontânea ou progredir, após um período de latência clínica de vários meses de duração para a forma mucosa em consequência de disseminação hematogênica e/ou linfática do parasita. Esse processo depende da resposta imune e da espécie de *Leishmania* envolvida. (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010) (Figura 4).

Na LC, a imunidade celular é preservada, o que pode ser verificado pela Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e por testes *in vitro* como proliferação celular e produção de IFN-γ pelas células mononucleares do sangue periférico estimuladas com

antígeno de *Leishmania*. Esses pacientes apresentam uma resposta imune celular específica bem modulada, mas com predominância de citocinas do perfil Th1 incluindo IFN-γ, o que reflete em tendência a cura espontânea e resposta eficiente ao tratamento. A partir da forma cutânea, quando a infecção não é controlada pelos mecanismos adaptativos da resposta imune celular, a doença pode evoluir para leishmaniose cutânea difusa (BRASIL, 2010; REITHINGER et al., 2007).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) caracteriza-se por apresentar anergia celular e está associada à acentuada proliferação de parasitas e disseminação da doença. Na LCD, testes como a IDRM, a proliferação celular e produção de IFN-γ em células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de *Leishmania* apresentam resultado negativo. Os pacientes apresentem baixa concentração de IFN-γ e IL-12 e uma substancial concentração de IL-4, IL-5 e TNF-α no soro, sendo o seu perfil de citocinas predominante Th2. A LCD é caracterizada pelo aparecimento de lesões nodulares e papulosas por toda superfície corporal e infiltrações cutâneas pronunciadas. As lesões, de maneira geral, não cicatrizam espontaneamente e são classicamente resistentes ao tratamento. A leishmaniose cutânea disseminada é caracterizada por lesões múltiplas, podendo ser acneiformes, papulares e também ulceradas, distribuídas em duas ou mais áreas não contíguas do corpo, distantes do sítio de inoculação primária. Essas lesões podem ser muito numerosas, mas respondem ao tratamento medicamentoso habitual. A forma disseminada usualmente apresenta a imunidade celular preservada, evidenciada pela positividade da IDRM (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003; REITHINGER et al., 2007) (Figura 4).

A leishmaniose mucosa (LM), também denominada espúndia, apresenta uma condição de difícil tratamento e prognóstico reservado quanto à possibilidade de cura. Está associada à *L.(V). braziliensis*, na maioria dos casos ocorrendo em um intervalo de tempo variável após a instalação da lesão cutânea inicial. Aproximadamente 3 a 5% dos pacientes infectados com *L.(V).braziliensis* podem desenvolver a forma mais severa da doença, a leishmaniose mucocutânea. Os fatores que contribuem para que uma doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não são de todo conhecidos, mas sabe-se que a demora na cicatrização da lesão primária e tratamento inicial inadequado podem estar associados. O acometimento mucoso pode surgir com a lesão cutânea ainda em atividade, ou anos após sua cicatrização. Dentre as lesões mucosas distinguem-se as seguintes variedades: forma úlcero-infiltrante e poliposa. Na maioria dos casos, a LM acomete a mucosa nasal, com importante comprometimento do septo, seguindo se em ordem de frequência o envolvimento da mucosa oral. Em ambos os casos o risco de deformidades permanentes é considerável (BRASIL,

2010; DA CRUZ et al., 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003; REITHINGER et al., 2007) (Figura 4).

Do ponto de vista imunológico, a LM caracteriza-se pelo exagero das respostas celulares anti-*Leishmania* e o pela escassez de parasitas. A IDRM é fortemente positiva, com áreas de enduração cutânea significamente superiores as observadas em LC. A resposta proliferativa e a produção de IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 estimuladas por antígenos de *Leishmania* em cultura de células mononucleares do sangue periférico são significamente maiores que as observadas em na LC. Esta resposta exacerbada do perfil Th1 promove a destruição do tecido onde houver depósito de partículas antigênicas. Na LM, este exagero na produção das citocinas Th1 associa-se a uma produção relativamente baixa de IL-10, uma citocina capaz de modular a resposta e inibir a ativação de macrófagos. Verificou-se que as células de pacientes com LM apresentam baixa capacidade de resposta a citocinas inibidoras da secreção de IFN-γ. Foi sugerido então que a incapacidade de promover uma modulação adequada da resposta Th1 nos casos de LM possa estar envolvida na patogênese dessa forma clínica. A resposta terapêutica da LM não é eficiente. Ainda que as lesões regridam ou mesmo desapareçam com os tratamentos convencionais, as recidivas são frequentes. Embora a resposta imune que se desenvolve na LM não seja capaz de controlar a doença e muito provavelmente seja responsável pelas manifestações clínicas, ela é capaz de conter a multiplicação parasitária (BRASIL, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Figura 4: Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

Legenda: A) forma cutânea localizada; B) forma cutânea localizada com infecção bacteriana secundária; C) forma cutânea disseminada; D) forma cutânea difusa; E) forma mucocutânea; F) Cicatriz característica.

Fonte: Figura A e C: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana (2007); Figura B: Da autora; Figura D: MEHTA et al (2009); Figura E: Calvopina et al (2006); Figura F: OMS (2007);

3.4. Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

Em virtude de um amplo espectro de lesões o diagnóstico da LTA é feito pela associação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (pesquisa parasitológica, diagnóstico imunológico e moleculares) (GONTIJO; CARVALHO,2003; GOTO-LINDOSO, 2010; REIS et al., 2006). O diagnóstico clínico pode ser feito com base na característica da lesão que o paciente apresenta, associada à anamnese, assim como a avaliação dos dados epidemiológicos da doença. O diagnóstico clínico-epidemiológico pode ser complementado pela Intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva e eventualmente pela resposta terapêutica. Entretanto, os métodos laboratoriais são fundamentais para o diagnóstico diferencial de outras doenças (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003) (Figura 5).

O diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente na pesquisa direta de parasitas em esfregaço das lesões após a coloração de *Giemsa* ou *Leishman*. Para essa pesquisa de parasitas utiliza-se o material coletado da escarificação do bordo de lesão, biópsia do bordo com impressão por aposição em lâmina de vidro e/ou punção aspirativa da lesão. Esse procedimento é considerado de primeira escolha por ser mais rápido e de menor custo. No entanto, a probabilidade de encontro do parasita é inversamente proporcional ao tempo de duração da lesão cutânea, sendo observado pequeno número de parasitas em lesões crônicas. Como todas as espécies de *Leishmania* são morfologicamente idênticas, essa técnica não é capaz de determinar a espécie do parasita. Sabe-se que a infecção secundária contribui para diminuir a sensibilidade do método (AMEEN, 2010; ANDRADE et al., 2009; BASANO; CARVALHO, 2003; GONTIJO; CARVALHO, 2003; BENSOUSSAN et al., 2006; VEGA-LÓPEZ, 2003) (Figura 5).

Culturas *in vitro* utilizando o meio Agar-sangue Novy-McNeal modificado por Nicolle-NNN também podem ser realizadas. A cultura dos promastigotas *in vitro* permite a identificação da espécie presente na lesão. Entretanto, as espécies de *Leishmania* apresentam capacidade de crescimento variável em cultura e esse método requer uma série de condições laboratoriais, pessoal treinado e mais de 10 dias para a aquisição de um número suficiente de promastigotas para as investigações. A sensibilidade global desse método está em torno de 50% para *L.(V.)braziliensis*. Além disso, pode ser realizada cultura *in vivo*, através da inoculação em animais de laboratório, de preferência, *hamster*, nas patas posteriores ou focinho. No entanto, além do longo tempo necessário para a evolução da lesão no modelo animal (2 a 9 meses em média) e da necessidade de um laboratório adequado, a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania* (AMEEN, 2010;

BASANO; ANDRADE et al., 2009 CARVALHO, 2003; GONTIJO; CARVALHO, 2004) (Figura 5).

Pode-se realizar o diagnóstico de forma indireta, através da mensuração da resposta imune celular com a injeção intradérmica de antígenos do parasita (Intradermorreação de Montenegro). Essa técnica detecta a hipersensibilidade celular retardada uma vez que a LTA caracteriza-se pelo aparecimento de uma resposta imune celular durante a doença e após a cura da infecção, seja de forma espontânea ou após o tratamento. A reação é medida em 48 a 72 horas, sendo consideradas positivas as reações com área de enduração igual ou maior que 5mm (BRASIL, 2010, GONTIJO; CARVALHO, 2003). Apesar da sua grande importância diagnóstica, deve ser lembrado que a positividade da IDRM não significa doença em atividade, significa apenas que o indivíduo já se expôs a antígenos do parasita. Geralmente, esta exposição deve-se à infecção por *Leishmania*, porém sabe-se que repetidas aplicações do próprio IDRM também podem induzir uma imunossensibilização capaz de conferir positividade ao teste. A resposta imune celular que se desenvolve com a infecção é normalmente duradoura. Assim, o teste permanece positivo após o tratamento, cicatrização da lesão cutânea tratada ou curada espontaneamente, podendo torna-se negativo nos indivíduos fraco-reatores e nos precocemente tratados.

A IDRM é positiva na grande maioria dos pacientes com LTA (BRASIL, 2010; GONTIJO;CARVALHO, 2003). Entretanto, em estágios iniciais da LC, é possível encontrar-se negativo, tornando-se positivo com a evolução da doença. É importante ressaltar o risco do estabelecimento de diagnóstico baseado apenas na IDRM positiva. Uma reação positiva não pode ser considerada como elemento suficiente para o diagnóstico em indivíduos moradores de área endêmica, visto que pode ser interpretada como leishmaniose anterior, leishmaniose em atividade, aplicação anterior de antígeno de IDRM, exposição ao parasito sem doença (infecção), hipersensibilidade ao diluente do teste ou reação cruzada com outras doenças (doença de Chagas, esporotricose, hanseníase virchowiana, tuberculose, cromomicose, entre outras). Esse é um teste útil para estudos epidemiológicos e para determinar prevalência da infecção em uma região (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010; OMS, 2010) (Figura 5).

Outros diagnósticos que podem ser utilizados são os exames histopatológicos (coloração pela hematoxilina-eosina), uso de anticorpos marcados com imunoperoxidase para detecção do parasita e testes sorológicos que proporcionam a detecção de anticorpos circulantes específicos contra antígenos parasitários, fornecendo parâmetros indiretos para o diagnóstico. Esses testes sorológicos incluem a reação de Imunofluorescência indireta, ELISA

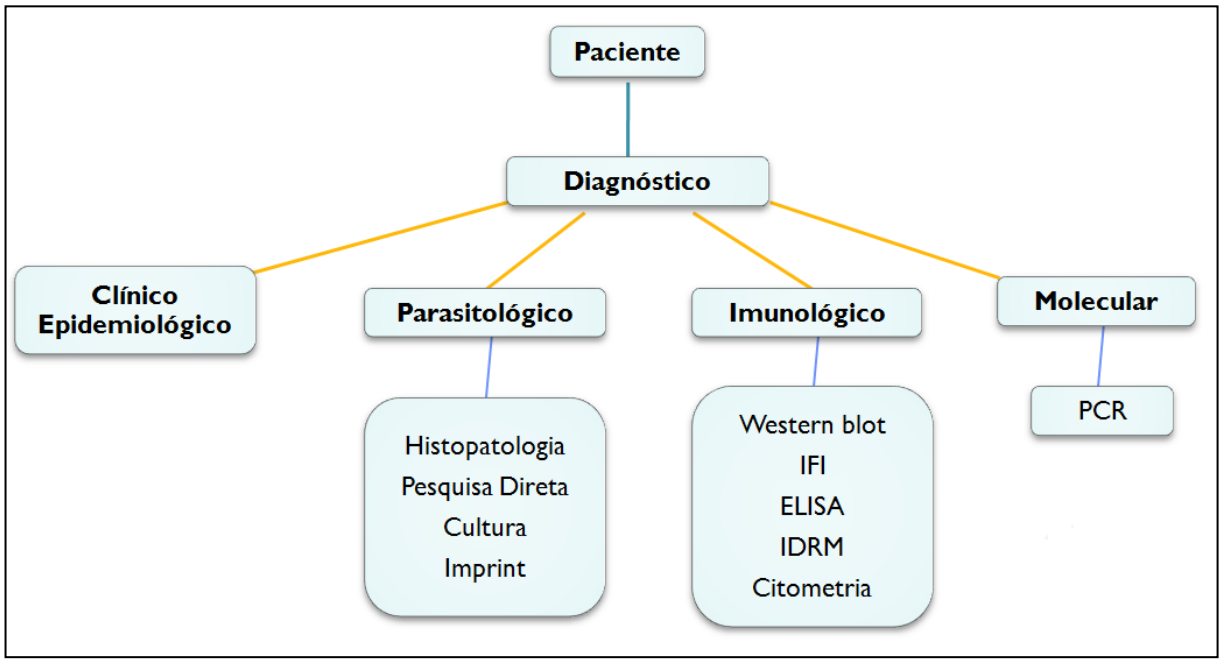
e Western Blot (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003) (Figura 5). Embora esses testes sorológicos sejam amplamente utilizados, eles não correlacionam os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença, além disso pode haver reações cruzadas com outros tripanossomatídeos (OLIVEIRA et al.,2013). Estudos mostram que a citometria de fluxo permite a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, sendo desse forma, uma alternativa para diagnósticos e critérios de cura após o tratamento em pacientes com LTA ativa (OLIVEIRA et a., 2013; ROCHA, 2002; 2006).

Além das técnicas acima citadas, há os métodos moleculares como o PCR convencional e a PCR quantitativa em tempo real para o diagnóstico de leishmaniose. A PCR convencional é uma técnica que permite amplificar em escala exponencial sequências de DNA. Apresentando alta sensibilidade é capaz de detectar quantidades tão pequenas quanto 1 fentograma de DNA de *Leishmana*, o equivalente a 1/10 do parasita. Essa técnica apresenta especificidade, rápida avaliação dos resultados, possibilidade de utilizar diferentes materiais biológicos e a possibilidade de detectar DNA de promastigota e amastigota. A PCR quantitativa em tempo real utiliza *primers* específicos para o gênero *Leishmania* permitindo a pesquisa de polimorfismos para identificar espécies de *Leishmania* e também mensurar a carga parasitária nas lesões. A PCR quantitativa em tempo real é uma técnica promissora e embora necessite de uma estrutura laboratorial adequada (equipamento caro e habilidade técnica), observa-se uma menor probabilidade de contaminações comparados ao PCR convencional (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003 GOTO;LINDOSO, 2010).

Na prática, no entanto, a conduta mais utilizada é a pesquisa direta de parasitas e a Intradermorreação de Montenegro, aliada ao aspecto clínico e ao antecedente epidemiológico (AMEEN,2010; BASANO; CAMARGO, 2003) (Figura 5).

Devido ao custo do tratamento e a sua possível toxicidade, além da existência de semelhanças entre as manifestações clínicas e sintoma na LTA com outras doenças, é importante fazer o seu diagnóstico preciso. O diagnóstico diferencial deve ser feito para outros possíveis problemas dermatológicos como: infecção cutânea por *Mycobacterium*, úlceras traumáticas ou estase venosa, lepra, infecções fúngicas, câncer, sarcoidose e infecções piogênicas da pele (como as por estafilococos e estreptococos) (GOTO; LINDOSO, 2010; OMS, 2010; REITHINGER et al., 2007).

Figura 5 :Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana



Fonte: Adaptado de GONTIJO;CARVALHO, 2003

3.5. Tratamento e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose cutânea é tratada para acelerar a cura e reduzir a formação de cicatrizes principalmente em locais como a face, prevenir a disseminação do parasita e as recidivas. O objetivo da quimioterapia é a cura clínica da lesão, a eliminação do parasita e aumentar a capacidade do hospedeiro em combater a infecção (AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; REITHINGER et al., 2007).

Em países onde a leishmaniose é endêmica, o ministério da saúde fornece tratamento gratuito para todos os pacientes. No entanto, sabe-se que geralmente esse tratamento não é viabilizado na prática devido aos estoques limitados, principalmente em áreas rurais. Além dessas dificuldades, estudos mostram que não existe um único e efetivo tratamento para todas as espécies do parasita e que esse tratamento é feito baseado na espécie de *Leishmania* infectante, na localização geográfica, disponibilidade, custo de drogas e na quantidade de lesões do pacientes. (AMEEN, 2010; GONZALES et al., 2009; GOTO; LINDOSO,2010; MONZOTE, 2009; REINTHINGER et al., 2007).

Os antimoniais pentavalentes são a droga de primeira escolha de todas as formas de leishmaniose cutânea causada por várias espécies de *Leishmania*, embora as formas mucosas

exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. Essas drogas estão disponíveis em duas formulações: antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®). No Brasil, o tratamento primariamente é feito com o Glucantime®. O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes não é totalmente esclarecido, entretanto, estudos mostram que essa droga interfere na bioenergética das formas amastigotas, inibindo tanto a glicólise como a oxidação de ácidos graxos (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003; MONZOTE, 2009).

Visando organizar o esquema terapêutico, a Organização mundial da saúde (OMS) recomenda que a dose do antimonial seja calculada em mg/Sb^{v}/Kg/dia (Sb^{v} = antimônio pentavalente). As lesões ulceradas podem sofrer contaminação secundária, razão pela qual devem ser prescritos cuidados locais. Segundo as recomendações do Ministério da Saúde/Fundação Nacional da Saúde para o uso do antimoniato de N-metilglucamina, nas formas cutâneas localizadas e disseminadas a dose varia entre 10 a 20 mg/Sb^{V}/Kg/dia. Sugere-se 15mg/Sb^{V}/Kg/dia tanto para adultos quanto para crianças, durante 20 dias seguidos, aplicados por via intramuscular ou endovenosa. Se não houver cicatrização completa três meses (12 semanas) após o término do tratamento, o esquema deverá ser repetido, prolongando-se, desta vez, a duração da série para 30 dias. Persistindo o insucesso terapêutico, deve ser utilizada uma das drogas de segunda escolha. Na forma difusa a dose é de 20mg/Sb^{V}/Kg/dia, durante 20 dias seguidos. Inicialmente pode-se observar relativa resposta terapêutica, porém são frequentes as múltiplas recidivas. Em todas as formas de acometimento mucoso a dose recomendada é de 20 mg/Sb^{V}/Kg/dia, durante 30 dias consecutivos, preferencialmente em ambiente hospitalar. Se não houver cicatrização completa três meses (12 semanas) após o término do tratamento, o esquema deverá ser repetido apenas uma vez. Pacientes não responsivos devem utilizar uma das drogas de segunda escolha (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010).

O longo período de tratamento permite que essas drogas leishmanicidas acumulem-se nos tecidos, particularmente fígado e baço ocasionado alta toxicidade e efeitos colaterais. Os efeitos colaterais mais frequentes são artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura, inchaço no local da aplicação, cardio, nefro e hepatotoxidade. Os pacientes, principalmente os mais idosos, devem ser submetidos à avaliação cardiológica prévia, além de serem monitorados por exames bioquímicos, hematológicos e eletrocardiograma. Por serem abortivos, os antimoniais não podem ser administrados a gestantes. Devido ao tratamento prolongado, a existência de efeitos colaterais e a via de administração da droga muitos pacientes desistem do tratamento levando ao surgimento de várias linhagens do parasita

resistentes a essas drogas leishmanicidas (GONTIJO; &CARVALHO, 2003; GONZALEZ et al., 2009; GOTO; LINDOSO, 2010; KEDZIERSKI, 2010; OMS, 2010; REINTHINGER et al., 2007).

A Anfotericina B, droga de segunda escolha no tratamento da LTA, é empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade de seu uso. Considerada mais eficaz que os antimoniais no tratamento das lesões mucosas, é apresentada em frascos de 50 mg para administração endovenosa. A dose inicial de 0,5 mg/kg/dia deve ser aumentada gradativamente, conforme a tolerância do paciente, até 1 mg/kg/dia. A administração deve ser feita em dias alternados, respeitando-se o limite máximo de 50mg (1 frasco) por aplicação, até a dose total de 1 a 1,5g para LC e de 2,5 a 3g para LM. Sabe que essa droga atua sobre o ergosterol, presente na membrana da *Leishmania*, aumentando a permeabilidade da membrana celular e permitindo o influxo de íons para dentro do parasita, tanto da forma promastigota quanto da amastigota, e consequentemente ocasionando a morte dos mesmos. Os efeitos colaterais mais comuns incluem náuseas, vômitos, febre, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas. A cardio e nefrotoxicidade, além do uso endovenoso, impedem seu uso fora do ambiente hospitalar. (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MANZOTE, 2009)

As Pentamidinas têm sido utilizadas com sucesso no tratamento da leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa. Essa droga atua sobre o genoma do parasita dificultando a replicação e a transcrição a nível mitocondrial. A dose preconizada é de 4mg/kg/dia, por via intramuscular profunda, 3 vezes por semana, por 3 a 4 semanas e recomendando-se não ultrapassar a dose total de 2g. Entre os efeitos colaterais destacam-se mialgia, dor no local da injeção, náusea, dor de cabeça, sensação de queimação, hipotensão, casos reversíveis de hipoglicemia e casos irreversíveis de diabetes mellitus insulino-dependente e morte (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MONZOTE, 2009).

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

medicamentos, localização e quantidade de lesões e potencial para disseminação (AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010)

Dessa forma, com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais, o custo e o índice de evasão do tratamento, vários estudos têm sido feitos nas últimas décadas visando o desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos, novas vias de administração (local, tópica e oral, por exemplo) e novos tratamentos. Atualmente, estudos mostram tratamentos com drogas orais como o cetoconazol, fluconazol e itraconasol, inicialmente utilizados para tratamento de infecções fúngicas e miltefosine, usado inicialmente para tratamento de câncer, além de tratamentos tópicos como paromomicina, azitromicina, imiquimod e tratamentos baseados no termosensibilidade das formas promastigotas do parasita, utilizando o frio e o calor através de técnicas como lâmpadas infravermelhas ou com luz ultravioleta, e/ou crio cirurgias com CO_2 ou nitrogênio liquido (CROFT et al., 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006).

Apesar de melhores regimes de tratamentos estarem disponíveis, a eliminação da LTA provavelmente será obtida com o uso de vacinação, que contribuiria também para a redução em longo prazo dos reservatórios potenciais, limitando a transmissão da doença (DUTHIE et al., 2012). É necessário, dessa maneira, o estudo de novos antígenos potencialmente candidatos à vacina e imunoprofiláticos. Essa ideia é originária da observação de que pacientes que se recuperam da leishmaniose apresentam uma sólida imunidade contra reinfecção (AMEEN, 2010; REINTHINGER et al., 2007; ROBERTS, 2006). Estudos da resposta imune celular na LTA, antes e após o tratamento quimioterápico, foram realizados utilizando-se extratos brutos, solúveis e insolúveis, além de moléculas individuais e recombinantes na tentativa de contribuir para identificação de novas moléculas imunogênicas do parasito (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012; CASTELLANO et al., 2009; COUTINHO et al., 1996; DA-CRUZ et al., 2002; LEOPOLDO et al., 2006; REIS, 2009 et al.; TELINO et al., 2005; TOLEDO et al., 2001). No entanto, testes em humanos com parasitos mortos e proteínas recombinantes resultaram em apenas imunidade de curta duração (SCHRIEFER et al.,2008).

No momento alguns testes clínicos com protótipos candidatos a vacinas podem ser encontrados. A vacina Leish-111f está na fase I e II de testes clínicos (tolerância imunogenicidade, eficácia e segurança) (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00111553). Já a vacina LEISH-F2+MPL-SE, que consiste na proteína de leishmania LEISH-F2 e no adjuvante MPL-SE está na fase II (eficácia, segurança e imunogenicidade) (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01011309). Outra vacina, que consiste em formas

autoclavadas de *L. major* associadas ao BCG e hidróxido de alumínio como adjuvante estão na fase II e III desses testes (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00429780). Apesar dos avanços e promessas, principalmente em modelos animais, ainda não se tem disponível uma vacina humana (KEDZIERSKI, 2010; NYLEN; GAUTAM, 2010; ROBERTS, 2006).

O critério de cura é clínico da LTA é baseado no acompanhamento mensal por três meses consecutivos e após cura clínica, por 12 meses após o término do tratamento. Na forma cutânea, o critério de cura é definido pelo aspecto clínico da lesão: reepitalização das lesões ulceradas e não-ulceradas, regressão total da infiltração e eritrema, três meses após a conclusão do esquema terapêutico. A resolução da doença resulta em uma cicatriz permanente e característica que, dependendo do tamanho e localização, podem causar trauma significativo no indivíduo afetado. Nas formas mucosas é definido pela regressão de todos os sinais e comprovado pelo exame otorrinolaringológico, até seis meses após a conclusão do esquema terapêutico. A cicatrização geralmente confere ao indivíduo proteção contra reinfecção, podendo essa ser restrita ou não a mesma espécie de *Leishmania* spp (BRASIL, 2010; BRITO et al., 2001; CARVALHO et al., 1995; GONTIJO; CARVALHO, 2003; REITHINGER et al., 2007).

O controle da LTA deve dispor de diferentes abordagens. Dentre elas, ressalta-se a vigilância epidemiológica com notificação de casos e tratamento; medidas de atuação na cadeia de transmissão, impedindo a infecção de vetores, hospedeiros e reservatórios; medidas educativas, incluindo a utilização proteção individual como mosquiteiros, telas finas nas janelas e portas, repelentes e roupas que protejam áreas expostas, e distanciamento das construções de matas. Outras abordagens incluem medidas administrativas como saneamento para evitar o acúmulo de lixo e de detritos que possam atrair roedores e pequenos mamíferos, que podem servir como reservatório, assim como melhorias das condições de habitação e capacitação de profissionais de saúde. O desenvolvimento de uma vacina eficiente e operacional seria uma medida definitiva e eficaz em termos de custos e prevenção (BRASIL, 2007; BASANO; CAMARGO, 2004; DESJEUX, 2004).

3.6. Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana

Estudos utilizando modelos experimentais de infecção por *L.major* em camundongos têm mostrado que a resposta imune mediada por células apresenta um importante papel no processo de cura e progressão da doença (REIS et al., 2006; CHOI; KROPF, 2009; KEDZIERSKI, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006). Nesses modelos experimentais, os

mecanismos de cura e resistência a infecção por *L. major* estão associados a ativação de macrófagos levando a destruição do parasita. Dessa forma, citocinas do perfil Th1 como IFN-γ e TNF-α tem demostrado um importante papel no processo de ativação de macrófagos e destruição do parasita. Por outro lado, os mecanismos de morbidade estão relacionados aos efeitos de citocinas do perfil Th2 como IL-10, IL-4 e TGF-β. Essas citocinas são capazes de inibir a diferenciação de linfócitos Th1 e a produção de IFN-γ e TNF-α (BARATTA-MASINI et al, 2007). A *Leishmania*, no entanto, tem a capacidade de direcionar a diferenciação das células T para uma resposta do tipo Th2, levando à persistência da infecção (BOGDAN, ROLLINGHOFF, 1998, REIS et. al., 2006).

A dicotomia observada em modelos experimentais de LC em camundongos não é demostrada em humanos, sendo os fatores que coordenam a resposta imune do hospedeiro e as manifestações clínicas durante a leishmaniose mais complexos do que em camundongos. Sabe-se, no entanto, que tanto em humanos como em animais as citocinas apresentam um importante papel na formação resposta imune do hospedeiro em infecções por *Leishmania* (CUMMINGS, 2010; SHARMA; SINGH, 2009).

Em humanos, o controle da leishmaniose cutânea é mediado por linfócitos T. Esses linfócitos T desempenham um papel fundamental na formação da resposta imune do hospedeiro através da secreção de citocinas, que pode atuar tanto de forma sinérgica e antagônica (CUMMINGS , 2010; SHARMA; SINGH, 2009; SOUZA et al., 2013). Os linfócitos T são fundamentais na resposta do hospedeiro a LTA: eles são decisivos para cura e geração de uma resposta imune protetora ao mesmo tempo em que são responsáveis pela persistência da doença e a sua patologia (CHOI; KROPF, 2009)

A resposta imune mediada pelos linfócitos T na infecção por *L. (V.) braziliensis*, comparada a *L. major*, tem sido menos estudada devido alguns fatores. A dificuldade no crescimento *in vitro* deste parasita, a ineficiente conversão em promastigotas metacíclicos, além da resistência de muitas linhagens de camundongos frente a infecção, devido à inabilidade dessa espécie de *Leishmania* de inibir a resposta Th1 (LIMA et al., 1999; REIS et al. 2009). Dessa forma, a dificuldade no estabelecimento do modelo experimental para *L. (V.) braziliensis* contribuiu e contribui para o surgimento de estudos com pacientes (CARVALHO et al., 1995; COUTINHO et al., 1996; DA-CRUZ et al., 2002; LEOPOLDO et al., 2006; TELINO et al., 2005)

Em todas as formas clínicas de LTA, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, aceita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade a infecção está relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2. No perfil Th1, citocinas como

interferon-gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) atuam na ativação de macrófagos induzindo a enzima iNOS a produzir óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, levando a destruição do parasita e resistência a infecção por *Leishmania*, enquanto citocinas do tipo Th2, como as interleucinas IL-4 e IL-10 estão ligadas à susceptibilidade a infecções por *Leishmania* (COUTINHO et al., 1996; BARATTA-MASNI et al., 2007). Sabe-se que a produção de NO pode ser regulada pelo fator β de crescimento e transformação (TGF-β). Neste caso, o parasita estimula a produção desta citocina, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN-γ. A indução de TNF-α ou TGF-β depende da presença e quantidade de IFN-γ no início da infecção (GREEN et al., 1994; BOGDAN, 2001). As diferentes manifestações clínicas são fortemente influenciadas pela resposta imune do hospedeiro (BACELLAR et al., 2002; PINHEIRO, 2004). A Figura 6 ilustra os diferentes subtipos de células T e seus papéis para ativação/inibição macrofágica.

Na forma cutânea localizada, as lesões são geralmente ulceradas e apresentam poucos parasitos com tendência para a cura espontânea ou uma boa resposta ao tratamento (DA-CRUZ et al., 2002). Há uma forte resposta de células T, com citocinas do tipo Th1, como IFN-γ e IL-12, e uma alta frequência de células B (LOUZIR et al., 1998; VIEIRA et al., 2002). A leishmaniose cutânea disseminada é caracterizada por várias lesões acneiformes e papulares, com parasitos raros ou ausentes, e é frequente o envolvimento das mucosas. As respostas imunológicas são bem variadas, tanto há uma forte resposta de células T como uma ausência de imunidade celular (CARVALHO et al., 1994; REIS et al., 2006) .Indivíduos com leishmaniose cutânea difusa apresentam múltiplos nódulos e falham em produzir uma resposta imune mediada por células durante a infecção, sendo incapazes de controlar a multiplicação parasitária e a progressão da doença em consequência da falta da expressão de mRNA para IFN-γ e da baixa expressão para IL-2. Esses pacientes não apresentam cura, são altamente resistentes à quimioterapia e exibem uma resposta do tipo Th2, com elevados níveis de IL-4 (CÁCERES-DITTMAR et al., 1993).

A leishmaniose mucocutânea (LM) é caracterizada por lesões destrutivas das mucosas, principalmente boca e nariz, não ocorrendo cura espontânea. Apresenta uma elevada resposta por células T específicas, tanto Th1 como Th2, sendo direcionada para uma resposta do tipo Th1 que é mais forte quando comparada com lesões cutâneas localizadas. A resposta exacerbada do tipo Th1 está associada a uma crônica e severa destruição tecidual, em razão de uma forte resposta inflamatória, e à escassez de parasitos nas lesões (BACELLAR et al., 2002). Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IFN-γ são produzidas, além de IL-4. Essa resposta é fracamente regulada por IL-10 e TGF-β, encontradas em níveis diminuídos,

mostrando que uma resposta inadequada do tipo Th1, considerada protetora na maioria das formas dessa doença, pode levar a uma imunopatogênese exacerbada (BACELLAR et al., 2002).

Além dos perfis Th1 e Th2, a resposta imune nas infecções por *Leishmania* tem sido cada vez mais aprofundada em termos de complexidade. Em alguns trabalhos, foi descrito o perfil Th3, induzido por TGF-β, que pode induzir e manter a tolerância periférica através de células T regulatórias (Treg) (CARRIER et al., 2007; WEINER, 2001). Também foi descrito o perfil Th17, que pode estar envolvido em processos que levam à cronicidade da doença (BETTELLI et al., 2008) ao aumenta a produção de múltiplos mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF-α e NOS2. Bacellar et al. (2009) demonstraram a produção de IL-17 durante a infecção por *L.(V.) braziliensis*, além de correlação direta entre esta citocina e TNF-α, indicando o possível envolvimento de IL-17 no progresso da LTA.

Estudos realizados por diferentes grupos de pesquisa tem estudado os mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento da doença em pacientes infectados por *Leishmania* através de técnicas de cultura celular e posterior dosagem de citocinas, em indivíduos com lesão ativa, antes e após tratamento quimioterápico e em pacientes curados espontaneamente (CARVALHO et al., 1995; GOMES-SILVA et al., 2007; REIS et al., 2009).

Diversos antígenos protéicos têm sido utilizados com a finalidade de induzir uma resposta imune benéfica, podendo ser considerados candidatos potenciais ao desenvolvimento de tratamentos baseados em imunoterapia e em vacinas. Além dessas proteínas, extratos brutos, solúveis e insolúveis de promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* têm sido utilizados para avaliação *in vitro* da resposta imune na tentativa de contribuir para a identificação de novas moléculas imunogênicas do parasita (ANTONELLI et al., 2004; DA-CRUZ et al. 2002; TELINO et al., 2005).

Trabalhos anteriores realizados por nosso grupo, com ambas às frações aqui estudadas demonstraram que o soro de pacientes com LTA ativa, PT e CE foram capazes de reconhecer antígenos da fração antigênica solúvel (30 kDa) e insolúvel (19 kDa). Diante dos resultados, sugeriu-se que esses antígenos poderiam ser utilizados como testes diagnósticos (BRITO et al., 2000; 2001). Em outros trabalhos, também demonstramos o potencial de estimulação antigênica das frações solúvel e insolúvel, e a sua capacidade de provocar linfoproliferação e estimulação da produção de citocinas Th1 e Th2 em PBMC de pacientes, mensuradas através de ensaios com incorporação de Timidina H_3 e ELISA, respectivamente (REIS et al., 2009; SOUZA, 2010).

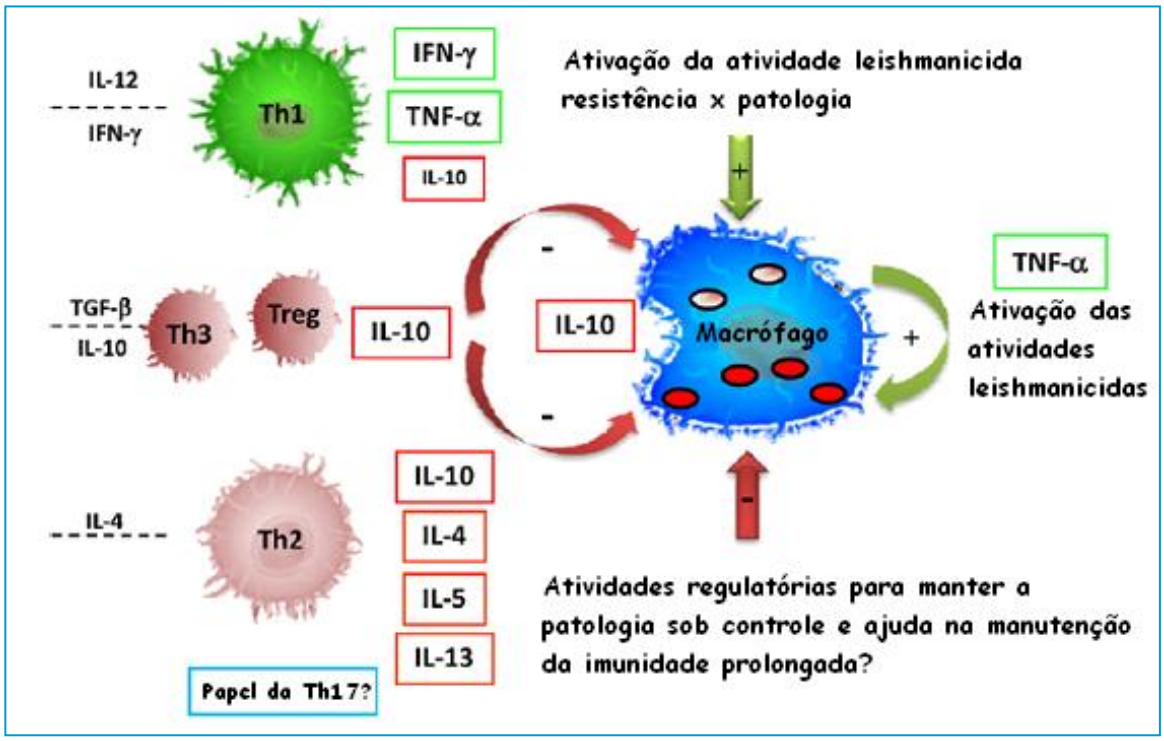
Souza (2012; 2013), avaliando a resposta imune celular em PBMC de pacientes com LTA ativa frente as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L(V.).braziliensis* antes do tratamento através da técnica de ELISA observou aumento na produção de IFN-γ e TNF-α e IL-10 em pacientes quando comparados ao grupo controle. Esses resultados sugeriram que apesar de pacientes terem sido capazes de apresentar uma eficiente resposta imune contra o parasita, pode haver um mecanismo imunorregulatório permitindo o controle da forte resposta inflamatória e , dessa forma, mantendo a integridade tecidual do hospedeiro.

Estudos anteriores sobre a resposta imune na LTA causada por *L. (V.) braziliensis*, utilizando PCR quantitativa em tempo real observaram que o mRNA para IFN-γ foi preferencialmente expresso na forma cutânea localizada em relação a outras citocinas, enquanto que IL-4, IL-5 e IL-10 foram detectadas nas formas mucosa e difusa da doença (CÁCERES-DITTMAR et al., 1993; PIRMEZ et al., 1993). Bacellar et al. (2002), também utilizando PCR quantitativa em tempo real, observaram uma forte expressão do gene para IFN-γ em pacientes com a forma muco-cutânea da doença. Em contraste, foram verificados baixos níveis de mRNA para IL-10 (GIULIETTI et al., 2001).

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) é um método bastante eficiente, sendo utilizado para detectar RNA mensageiro (mRNA) para citocinas em diversos tecidos. Com o desenvolvimento da técnica de PCR tempo real quantitativa (qPCR), é possível visualizar e quantificar os produtos de RT-PCR no decorrer da reação (GIULIETTI et al., 2001).

Atualmente, as pesquisas buscam identificar marcadores imunológicos que permitam compreender os processos que levam a formação da lesão na LTA, como também os mecanismos responsáveis pela resistência e cura da doença. Dessa forma, devido ao surgimento do perfil Th3, perfil Th17 e as células T regulatórias há a necessidade de reavaliar a importância do perfil Th1 e Th2 frente à infecção por *Leishmania (V.) braziliensis.* Além disso, embora existam vários estudos sobre os perfis Th1 e Th2, não existe um padrão de resposta imune estabelecido frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* e a associação da expressão desses mediadores com tempo, tamanho e numero de lesões e a resposta a IDRM.

Figura 6: Esquema demostrando a resposta imune na LTA



Fonte: Adaptado de GOLLOB et al., 2008.

Nota: As células T $CD4^+$ Th1, estimuladas por IL-12 e IFN-γ, produzem IFN-γ e TNF-α, que levam à ativação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) estimulando os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), levando à morte intracelular do parasita. As células T $CD4^+$ Th2, por sua vez, são estimuladas por IL-4 e produzem IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13, que inibem a produção de NO, dificultando o combate ao parasita. O perfil Th3, induzido por TGF-β e IL-10, estimula a produção de IL-10, que inibe a produção de NO, levando à resistência do parasita. Células T reg atuam também na mediação da resposta por células efetoras.

4. METODOLOGIA

4.1. Considerações Éticas

Os procedimentos para coleta de sangue foram realizados somente após o indivíduo concordar em assinar o "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" (TCLE) (apêndices A, B e C). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM-FIOCRUZ com o projeto "Caracterização da resposta imune celular na leishmaniose tegumentar americana ativa e após cura clínica", do qual o presente estudo faz parte (CEP/CPqAM n° 60/05, CAAE n° 0757.0.095.000-05, Anexos A e B).

4.2. Tipo de Estudo e Amostragem

O estudo foi do tipo experimental (não-randomizado). Foram realizadas comparações entre um grupo de participantes que apresentaram LTA ativa e outro formado por sujeitos sem história prévia de LTA, denominado controle. Ambos foram escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

4.3. População de estudo

Os pacientes do presente estudo foram provenientes de Recife, Chã da Alegria, Moreno, Araçoiaba, Olinda e Jaboatão dos Guararapes. Foram selecionados 27 pacientes portadores de lesão ativa, de ambos os sexos e idade igual ou superior a 12 anos. Para esta seleção, foram observados os seguintes critérios: apresentação de uma ou mais lesões cutâneas ativas, ausência de tratamento quimioterápico prévio e diagnóstico confirmado para LTA realizado em colaboração com pesquisadores pertencentes ao Serviço de Referência em Leishmanioses (SRL) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM). Os pacientes com lesão ativa foram atendidos no ambulatório do CPqAM, onde foram esclarecidos do objetivo do estudo e foram acompanhados para realização de exames clínico-laboratoriais e para os procedimentos de coleta de sangue.

O grupo controle (n = 6) constituiu-se de indivíduos saudáveis, com idade acima de quinze anos, residentes em área não endêmica e sem história prévia de transfusão sanguínea. O material coletado foi processado no CPqAM/FIOCRUZ, na cidade de Recife-PE. Os

procedimentos para coleta de sangue só foram realizados após todos os indivíduos concordarem em assinar o "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" (Apêndice C).

4.4. Exames laboratoriais para avaliação dos pacientes

Após avaliação clínica no núcleo de vigilância de saúde dos municípios da localidade de origem, os pacientes foram encaminhados ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães CPqAM-FIOCRUZ onde forneceram seus dados (idade, tempo, número e tamanho de lesão) (Apêndice D) e foram submetidos a alguns procedimentos laboratoriais para confirmação da doença. Os exames incluíram: Intradermorreação de Montenegro (IDRM); pesquisa direta através de escarificação da borda da lesão com lâmina de bisturi estéril, e posterior coloração por *Giemsa*; reação de Imunofluorescência indireta (IFI) e PCR convencional que utilizará *primers* específicos: B1 (5'- GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3') para o subgênero *Viannia*, tendo como alvo a região do mini-círculo do kDNA, os quais amplificam um fragmento de 750 pb (DE BRUJIN; BARKER, 1992; SAMBROOK; FRITSHI; MANIATIS, 1989).

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

Formas promastigotas (cepa MHOM/BR/75/M2903) foram expandidas em cultura com meio Schneider's (Sigma, St. Louis, MO) contendo 10% de soro fetal bovino (SBF; Cultilab, Campinas,SP, Brasil) e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 mg/ml – Sigma, St. Louis, MO) até a fase de crescimento exponencial. A massa parasitária foi então submetida a três lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2) através de centrifugações a 800 x g, por 15 minutos, a 4ºC. O sedimento resultante foi armazenado a – 20ºC até o momento do uso.

Para a obtenção dos antígenos, as alíquotas estocadas foram descongeladas, ressuspendidas em água destilada contendo inibidores de proteases (metil-fenil-fluoreto – PMSF, 0,01mM e ácido etilenodiaminotetracético – EDTA, 2mM) e pepstatina A, 0,001M (Sigma, St. Louis, MO). Em seguida, foram ultrassonicadas (100w, 10 ciclos de 30 segundos com 2 pulsos por segundo) e centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante removido foi submetido a uma nova centrifugação a 100.000 x g durante uma hora, à mesma temperatura. O sobrenadante resultante correspondente ao antígeno solúvel e o sedimento, antígeno insolúvel de *L. (V.) braziliensis*, foram submetidos a uma dosagem

protéica segundo o método de Bradford (1976) modificado por Read & Northcote (1981), além de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). Após esses procedimentos, os antígenos foram armazenados a –20ºC até a utilização nos ensaios de cultura celular (BRITO et al., 2000)

4.6. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Quarenta mililitros de sangue foram coletados utilizando-se o sistema a vácuo (Vacutainer®). O sangue foi diluído em PBS pH 7,2 na proporção 2:1 e transferido para tubos cônicos contendo Ficoll-Paque (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia), também na proporção 2:1. Após centrifugação a 900 x g por 30 minutos a 20ºC, a camada de PBMC obtida entre a mistura de Ficoll-Paque e o plasma foi removida e depositada em novos tubos cônicos. Foi adicionado 40mL de PBS pH 7.2 e posteriormente realizada uma centrifugação a 300 x g por 15 minutos a 20ºC, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 10 ml de PBS (pH 7,2) e novamente centrifugado a 300 x g, durante o mesmo tempo e mesma temperatura. Depois do descarte do sobrenadante, o sedimento composto de PBMC foi ressuspendido em meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Cultilab, Campinas,SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas,SP, Brasil).Uma alíquota da suspensão celular foi então removida, diluída 1:20 em azul de trypan (Sigma, St. Louis, MO) e quantificada em câmara de Neubauer, sendo feito o ajuste para o ensaio.

4.7. Cultura de células mononucleares do sangue periférico

As PBMCs foram cultivadas em placas de 24 poços (TPP Trasadingen, Switzerland), na concentração de 10^6 células/poço. O cultivo foi realizado em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 1% de L-glutamina 200 mM, 1% piruvato de sódio 100 mM, 0,2% de bicarbonato de sódio 7,5% e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas,SP, Brasil). As PBMCs foram estimuladas com os antígenos solúvel (1,25µg/ml) e insolúvel (2,5µg/ml) de *L. (V.) braziliensis*. Como controle positivo do ensaio, foi utilizado o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (Cultilab) na

concentração de 5μg/ml, respectivamente. As placas foram mantidas em estufa à 37ºC/5% de CO_2 durante 24 horas.

4.8. Obtenção de RNA a partir de PBMC

Após 24 horas de cultura das PBMCs, as placas passaram por centrifugação (1800 x g por 10 min, a T.A.) O sobrenadante foi coletado, armazenado e o pellet de PBMC em cada poço da placa foi removido através de raspagem, utilizando-se 1mL de PBS gelado. Em seguida, a suspensão celular resultante foi transferida para microtubos de 1,5 mL, identificados por estímulo. Procedeu-se à centrifugação dos microtubos à 300 X g por cinco minutos à 4ºC, o sobrenadante foi descartado e o pellet de PBMC ressuspendido em TRIzol (Life Technologies Carlsbad, CA). O Trizol é uma solução monofásica de fenol e isocianato de guanidina que rompe a célula mantendo a integridade do RNA. Após leve agitação em vórtex, as células foram armazenadas à –80ºC até a utilização nos ensaios de extração de RNA.

Neste processo, as células armazenadas foram descongeladas até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados a cada microtubo 200 μl de clorofórmio P. A., submeteu-se o microtubo a leve agitação manual e incubação por 3 minutos. Após centrifugação a 10.000 X g por dez minutos a 4ºC, ocorre a separação da solução em 3 fases (aquosa, interface e orgânica). Na fase aquosa, também chamada de polar, contém o RNA e na interfase e fase orgânica, fase também denominada de apolar, encontram-se o DNA, resíduos celulares e proteínas, respectivamente. O sobrenadante contendo RNA foi então transferido para novos microtubos, onde foram adicionados 500μl de isopropanol, promovendo a precipitação do RNA. Após leve agitação manual e incubação por dez minutos à T. A., as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 X g por dez minutos a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido a duas centrifugações a 7500 X g por cinco minutos a 4ºC na presença de álcool 75%. O sobrenadante resultante foi então descartado e o pellet de RNA foi submetido a secagem à T. A., por dez minutos. Após esta etapa, foram adicionados aos microtubos 30ul de água livre de RNAse e colocado no termobloco por 5 min. Após a extração, o RNA obtido foi quantificado utilizando o espectofotômetro NanoDrop™ (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts) no comprimento de onda (λ) de 260nm e 280nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da relação 260/280nm, sendo consideradas as relações que apresentaram valores de razão entre 1,6-1,9.

Após esse processo, a partir das concentrações obtidas, todas as amostras foram normalizadas para uma única concentração. Em seguida as amostras foram estocadas a –80ºC até o momento da utilização em ensaios de transcrição reversa.

4.9. Ensaio de transcrição reversa

Para a transcrição reversa foi utilizado o kit "TaqMan® Reverse Transcription Reagents" (Applied Biosystems), segundo protocolo do fabricante. O RNA obtido a partir de PBMC pelo método do TRIzol foi submetido a conversão em cDNA em um termociclador (Eppendorf master cycler gradient).

A RT-PCR foi realizada em volume final de 50µl, contendo TaqMan RT Buffer 1x, $MgCl_2$ 5,5mM, Mix de dNTPs 500µM, Hexâmeros randômicos 2,5µM, inibidor de RNAse 0,4 U/µL, a enzima *multiscribe reverse transcriptase* 3,125 U/µL e 12,375µL de amostra. A reação consistiu de um ciclo, sendo este dividido em dez minutos a 25ºC, trinta minutos a 48ºC e cinco minutos a 95ºC. Após esta etapa, as amostras foram armazenadas a -20ºC até a utilização nos ensaios de PCR quantitativa em tempo real.

4.10. Avaliação da expressão gênica para citocinas

Para realização da quantificação da expressão dos genes IFN-γ, TNF- α, TGF-β, IL-10, IL-4, e iNOS foi realizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR). As reações foram realizadas no equipamento ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems), instalado no núcleo de plataformas tecnológicas (NPT) no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. A reação foi confeccionada em volume final de 20µL, contendo TaqMan Universal PCR Master Mix (2x), TaqMan Gene Expression Assay para IFN-γ (Assay ID: Hs99999041_m1), IL-10 (Assay ID: Hs 00174086_m1), TNF-α (Assay ID: Hs 00174128_m1), IL-4 (Assay ID: Hs 99999030_m1), TGF-β (Assay ID: 99999918_m1) e iNOS (Assay ID: H s00167257_m1) constituído de *primers* e sonda específicos do tipo MGB marcadas com corante fluorescente FAM™ na extremidade 5' e o NFQ na extremidade 3', água livre de RNAse e 1µL de amostra.

Em paralelo, como controle endógeno (gene de referência) da reação foi utilizado RNA ribossomal 18S, cuja reação foi preparada com TaqMan Universal PCR Master Mix,

primers forward e *reverse* para RNA ribossomal 18S, sonda para RNA ribossomal 18S marcadas com o fluoróforo VIC na extremidade 5', água livre de RNAse e 1μL de amostra. A fluorescência passiva da reação foi medida através da utilização do fluoróforo ROX. As reações foram realizadas em triplicatas para a quantificação de cada gene em relação a cada estímulo em cada amostra em conjunto com dois controles negativos da reação (NTC). Foram realizadas reações distintas para cada gene assim como para o controle endógeno (18S). Por isso, em cada placa (96 poços) realizada, as amostras tinham o gene do 18S quantificado e os genes específicos em poços separados. Foram realizados 40 ciclos com as seguintes condições de amplificação: 10 minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

A expressão de mRNA para IFN-γ, TNF-α, IL-10, TGF-β, IL-4 e iNOS para cada estímulo foi calculada pelo método do Ct comparativo, sendo os valores obtidos normalizados com o gene de referência (ΔCt). Este cálculo foi feito da seguinte maneira: ΔCt = Ct (Alvo) – Ct (RNA 18S), onde Ct corresponde ao ponto no gráfico onde a amplificação torna-se exponencial. Após a normalização dos valores do gene alvo, o ΔCt deste foi subtraído do ΔCt de um elemento calibrador (ΔΔCt). Este foi escolhido de acordo com a situação a ser analisada, seja em comparação ao grupo controle ou entre os grupos de pacientes. Foi utilizada a fórmula ΔΔCt = ΔCt (amostra) – ΔCt (calibrador), onde ΔCt (amostra) corresponde a um parâmetro de interesse a ser relativizado. Obtido o ΔΔCt, este é aplicado na fórmula $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, obtendo-se assim a quantidade relativa de mRNA para as citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-4 e para a enzima iNOS expressa em determinada amostra (LIVAK; SCHMITTEN,2001). A Tabela 1 resume os ensaios realizados nesse trabalho e relaciona quais pacientes foram analisados para cada alvo específico.

4.11. Correlação entre a expressão das citocinas e os dados clínicos dos pacientes

O tempo, tamanho e número de lesões das lesões clínicas apresentados no momento da coleta do material para análise foram correlacionados com a resposta a IDRM, bem como, com a expressão gênica para os mediadores imunológicos acima citados. Esses dados foram analisados utilizando o teste de Spearman. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ($p<0,05$= estatisticamente significativos). Os softwares utilizados foram o Excel 2007 e o GraphpadPrism 5.0.

4.12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o suporte técnico do Laboratório de Métodos Quantitativos do Núcleo de Saúde Coletiva do CPqAM, empregando-se testes não paramétricos. A análise para medir a variabilidade intra-grupo foi realizada pelo teste dos postos sinalizados de Wilcoxon. Já entre os grupos o teste U de Mann-Whitney foi utilizado. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ($p<0,05$ = estatisticamente significativos). Os softwares utilizados foram o Excel 2007 e o GraphpadPrism 5.0.

Tabela 1 - Ensaios experimentais realizados nesta pesquisa.

				Condições experimentais	
Quantidade inicial de pacientes	Alvos	Ensaio	*n* e pacientes realizados	Tempo de cultivo	Estímulos utilizados
27	TNF-α e 18S	Extração de RNA, Transcrição Reversa, Cultura celular e qPCR	21 (1-21)	24h	PHA, AgSol, AgIns
	IFN-γ e 18S	Extração de RNA, Transcrição Reversa, Cultura celular, e qPCR	27	24h	PHA, AgSol, AgIns
	iNOS e 18S	Extração de RNA, Transcrição Reversa, Cultura celular, e qPCR	27	24h	PHA, AgSol, AgIns
	IL-10 e 18S	Extração de RNA, Transcrição Reversa, Cultura celular e qPCR	27	24h	PHA, AgSol, AgIns
	IL-4 e 18S	Extração de RNA, Transcrição Reversa, Cultura celular e PCR	18 (11-21; 04, 06, 08, 10, 22, 23, 25)	24h	PHA, AgSol, AgIns
	TGF-β e18S	Extração de RNA, Transcrição Reversa, Cultura celular e PCR	17 (01-04; 06-15;16-18)	24h	PHA, AgSol, AgIns

Nota**:** As células foram estimuladas com Fitohemaglutinina (PHA, 5,0µg/ml) e com antígenos solúvel (AgSol, 1,25µg/ml) e insolúvel (AgIns, 2,5µg/ml) de *Leishmania (V.) braziliensis* por 24h*; n*=número de pacientes realizados; qPCR=PCR quantitativa em tempo real. Os números entre parênteses representam a identificação dos pacientes que foram utilizados para cada alvo cujos dados constam na tabela 2.

5. RESULTADOS

5.1. Dados da população de estudo

Foram selecionados vinte e sete pacientes com lesão ativa (AT), obedecendo-se os critérios de inclusão e exclusão. Embora não tenha se realizado em paralelo um estudo epidemiológico, foram observadas algumas características na população de estudo: como idade, sexo e localidade de origem, forma clínica, número de lesões, localização das lesões e tempo de evolução da doença. A Tabela 2 descreve os dados dos pacientes de acordo com os critérios acima citados.

Em relação ao sexo, foi observado o acometimento de 16 mulheres e 11 homens, sendo 25 adultos com média de idade de 31,18±13,68 anos e 2 crianças (12 e 13 anos). Dos 27 pacientes, 11 eram trabalhadores da zona rural.

O tempo de evolução da doença, contado desde o surgimento da lesão até a procura do paciente pelo núcleo de vigilância em saúde dos municípios apresentou uma média de 7,37± 4,10 semanas, variando de 10 dias a 4 meses (Tabela 2).

O grupo controle (CT) foi representado por 6 indivíduos saudáveis de área não endêmica, sem histórico da doença e com idade entre 20 e 51 anos. A média de idade dos controles foi de 36,5±12,08 anos.

Os pacientes foram provenientes dos municípios de Chã de Alegria (n = 1), Araçoiaba (n = 1), Moreno (n = 21), Jaboatão dos Guararapes (n=1), Recife (n=2), Olinda (n=1) (Tabela 2). Chã da Alegria, Araçoiaba e Moreno são localizados a 52 km, 49 km e 28 km da cidade do Recife respectivamente, sendo Chã da Alegria considerada Região de Mata Pernambucana, enquanto que Araçoiaba e Moreno fazem parte da Região Metropolitana do Recife. Já Jaboatão dos Guararapes e Olinda, são localizados a 14 Km e 7 Km, respectivamente e também são considerados região metropolitana do Recife (IBGE, 2008).

Os pacientes apresentaram de 1 a 4 lesões cutâneas ulceradas com bordas elevadas e fundo granulomatoso com área total aproximada variável entre 1,5 e 60 cm² (média de 14,18 cm^2 ± 13,68). Três pacientes apresentaram lesão do tipo eritematosa, placa crostosa e úlcera papulosa, respectivamente. A maior parte das lesões estava distribuída por áreas descobertas do corpo. Em relação ao número de lesões, 18 pacientes apresentaram 1 lesão (66,66%), 7 pacientes apresentaram 2 lesões (25,92%), 1 paciente apresentou 3 lesões (3,7%) e 1 paciente apresentou 4 lesões (3,7%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados de pacientes com LTA ativa atendidos no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- CPqAM- FIOCRUZ, no período de 2008-2010 quanto a idade, sexo, localidade de origem, número de lesões, forma clínica, local da lesão, tempo de evolução e tamanho das lesões.

Pacientes	Idade (anos)	Sexo	Procedência	nº de lesões	Forma clínica	Local da lesão	Tempo de evolução	Tamanho da lesão (cm^2)
01	42	M	Moreno	2	LC	Joelho E/ Braço D.	1mês	18/4
02	28	F	Moreno	1	LC	TornozeloD.	1mês	15
03	32	F	Moreno	1	LC	Perna D.	2 meses	60
04	12	M	Moreno	3	LC	Cotovelo D./Perna e Pé.E.	10 d	10,5/48/10,5
05	43	M	Moreno	1	LC	Perna D.	2 meses	4
06	57	F	Moreno	1	LC	Perna D.	1mês	15
07	19	F	Moreno	1	Placa crostosa	Supra Orbital D.	4meses	6
08	24	F	Moreno	2	LC	Perna E.	1mês	10/15
09	16	M	Moreno	2	LC	Face/BraçoE.	3 meses	4/NI
10	20	M	Moreno	2	LC	Coxa D.	1mês e 15 d	5/4
11	43	F	Recife	1	LC	TornozeloE.	2 meses	12
12	26	F	Moreno	1	LC	Perna E.	2meses	12
13	13	F	Moreno	1	LC	Joelho E.	3meses	15
14	32	M	Olinda	1	LC	AntebraçoE.	3meses	1,5
15	21	F	Moreno	1	LC	Coxa E.	1mês e 15 d	25
16	22	F	Moreno	1	Eritrematosa	Antebraço	2meses	12
17	15	F	Moreno	4	Ulcera Papulosa	BraçoD/ PernaE.	1mês	6,25/8/ NI/NI
18	43	F	Jaboatão	2	LC	Punho E/BraçoE.	15 d	4,5/2,25
19	23	M	Recife	1	LC	Perna D.	4meses	18
20	45	F	Moreno	1	LC	Perna E.	1mês	1,6
21	44	M	Moreno	1	LC	NI	1mês e 10d	4,2
22	58	M	Moreno	1	LC	Perna D.	1mês	18
23	20	F	Chã da Alegria	2	LC	Coxa D.	2meses	8/7,5
24	56	M	Araçoiaba	1	LC	Perna D.	3meses	39
25	28	F	Moreno	2	LC	Pe E.	15 d	27
26	26	F	Moreno	1	LC	Perna D.	2meses	36
27	34	M	Moreno	1	LC	Perna E.	3meses	6

Legenda: M = masculino, F = feminino, LC = leishmaniose cutânea, d =dias; E=Esquerdo; D=Direito; NI=Não informado. Nota: Os pacientes com LTA foram captados no período de 2008-2010.

De acordo com os parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, todos os pacientes participantes deste estudo foram diagnosticados como portadores da LTA em colaboração com pesquisadores pertencentes ao Serviço de Referência em Leishmaniose do CPqAM/Fiocruz-PE (Tabela 3). Os exames laboratoriais realizados por esse serviço incluíram IDRM, IFI, PCR convencional e Pesquisa direta, tendo os pacientes apresentado resultados positivos em pelo menos dois dos exames, confirmando o diagnóstico da LTA.

A IDRM foi realizada em 25 dos 27 pacientes desse estudo, que apresentaram endurações iguais ou maiores que 5mm após 48 horas, resultado considerado positivo em 25 dos 25 pacientes testados (100% de positividade). Já a IFI foi realizada em 21 dos 27 pacientes do estudo, sendo positiva em 61,90% dos casos (13 dos 21 pacientes testados). A pesquisa direta, realizada em 25 dos 27 pacientes desse estudo, 14 dos 25 pacientes analisados apresentaram resultados positivos, apresentando 56% de positividade. Por fim, a PCR convencional foi realizada em amostras de 22 dos 27 pacientes do estudo, 17 dos 22 pacientes apresentam resultados positivos, apresentando 77,27% de resultados positivos (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado dos testes laboratorias realizados em pacientes com Leishmaniose tegumentar ativa em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmanioses atendidos no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- CPqAM- FIOCRUZ, no período de 2008-2010.

Pacientes	IDRM[1]	Pesquisa direta	IFI[2]	PCR[3]
01	6mm	+	NR	+
02	8mm	+	-	+
03	10mm	+	-	+
04	8mm	NR	NR	NR
05	9mm	+	+	+
06	7mm	+	+	+
07	12mm	NR	NR	NR
08	8mm	+	NR	+
09	10mm	+	NR	-
10	10mm	+	NR	-
11	NR	-	+	+
12	10mm	-	+	+
13	10mm	-	+	+
14	11.5mm	-	+	NR
15	14mm	-	+	+
16	10mm	-	-	NR
17	12mm	-	+	+
18	16mm	-	-	+
19	14mm	+	-	+
20	9mm	+	-	+
21	14mm	+	+	+
22	8mm	+	+	-
23	NR	-	+	+
24	9mm	-	+	+
25	5mm	+	-	-
26	10mm	+	-	NR
27	10mm	-	+	-

[1]IDRM: Teste de intradermorreação de Montenegro; [2]IFI: Imunofluorescência Indireta;[3]PCR: Reação em cadeia da polimerase; +: Positivo; -: Negativo; NR: Não realizado.

5.2. Expressão gênica para os mediadores imunológicos Th1, Th2 e a citocina TGF-β em pacientes com LTA ativa

A Figura 7 mostra a expressão de mRNA para as citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-10, IL-4, TGF-β por PBMC dos pacientes com LTA ativa (AT) e do grupo controle (CT) cultivadas em presença de PHA, antígeno solúvel e antígeno insolúvel de *L.(V).braziliensis* por 24h após normalização com o gene de referência (ΔCT).

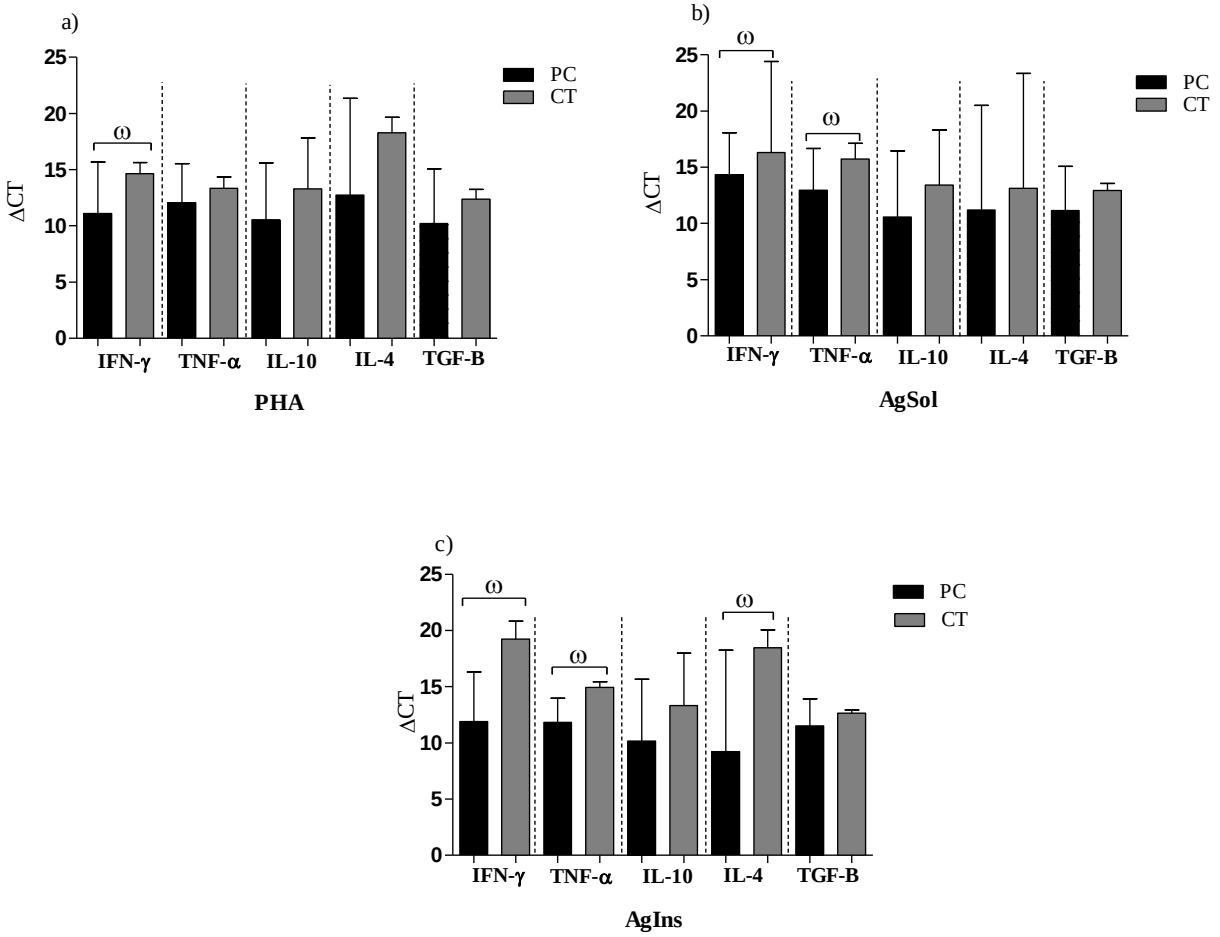
Sob estímulo de PHA, observou-se expressão de mRNA para todas as citocinas avaliadas em ambos os grupos, apresentando diferença significativa na expressão gênica de IFN-γ em pacientes comparados ao grupo controle. Os pacientes de LTA ativa (ΔCT=11,10± 4,58) apresentaram uma expressão de mRNA para IFN-γ 11,78 vezes maior frente ao mitógeno em relação ao grupo controle (ΔCT=14,66±0,96) (p=0,016) (Tabela 4).

O antígeno solúvel estimulou PBMC a expressar mRNA para todas as citocinas em ambos os grupos, apresentando diferença significativa na expressão de TNF-α e IFN-γ em pacientes em relação ao grupo controle. Considerando a citocina TNF-α, os pacientes com LTA ativa (ΔCT=12,96±3,70) apresentaram um expressão gênica 6,89 vezes maior quando comparados ao grupo controle (ΔCT=15,75±1,38) (p=0,024). Ao observar a citocina IFN-γ, a expressão gênica em pacientes com LTA ativa (ΔCT=14,33±3,74) foi 3,92 vezes maior em relação ao grupo controle (ΔCT=16,30±8,11) (p=0,025) (Tabela 4).

Em relação ao antígeno insolúvel, observou-se expressão de mRNA para todas as citocinas em ambos os grupos, apresentando diferença significativa na expressão de TNF-α, IFN-γ e IL-4 em pacientes comparados ao grupo controle. Em relação a TNF-α, observou-se que os pacientes com LTA ativa (ΔCT=11,85±2,12) apresentaram uma expressão de mRNA 8,58 vezes maior quando comparados ao grupo controle (ΔCT= 14,95±0,50) (P=0,002). Considerando a citocina IFN-γ, os pacientes com LTA ativa (ΔCT=11,9±4,41) apresentaram uma expressão de mRNA para essa citocina citocina 160,35 vezes maior em relação ao grupo controle (ΔCT= 19,23±1,584) (p=0,0004). Ao verificar a citocina IL-4, os pacientes com LTA ativa (ΔCT=9,21±9,02) apresentaram uma expressão de mRNA para IL-4 609,17 vezes maior em comparação com o grupo controle (ΔCT=18,47±1,57) (p=0,0451) (Tabela 4).

Considerando a citocina IL-10 e TGF-β, embora tenha sido verificada expressão dessa citocina frente a todos os estímulos utilizados, não se observou diferença significativa (p>0,05) (Tabela 4).. Ao observar a expressão de iNOS, não houve expressão dessa enzima entre e intra-grupos frente aos estímulos utilizados

Figura 7 - Expressão gênica para IFN-γ, TNF-α, TGF-β, IL-10, IL-4 por PBMC de pacientes com LTA ativa em comparação com o grupo controle frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis.*



Nota: As células foram estimuladas com Fitohemaglutinina (PHA, 5,0µg/ml) e com antígenos solúvel (AgSol, 1,25µg/ml) e insolúvel (AgIns, 2,5µg/ml) de *Leishmania (V.) braziliensis* por 24h. A letra grega ω (ômega) representa as comparações com diferença estatísticasignificativa entre pacientes (barra vertical preta) e controle (barra vertical cinza). As barras verticais representam o desvio padrão

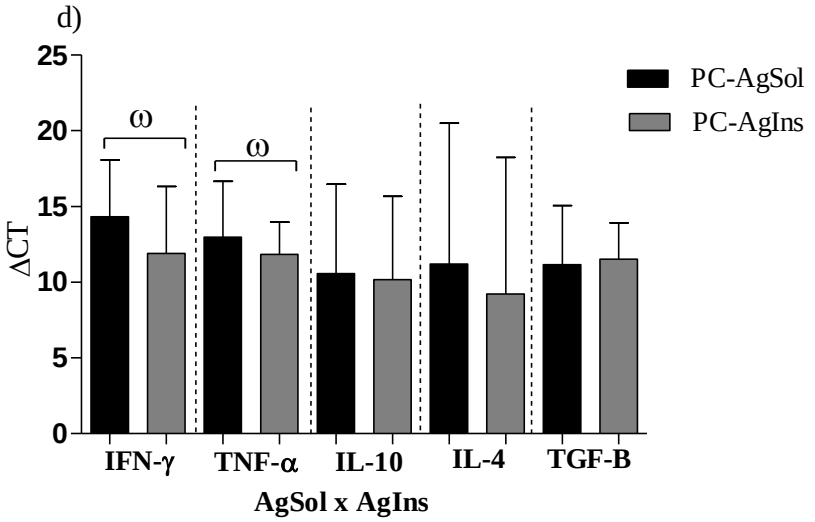
5.3. Comparação da expressão gênica para os mediadores imunológicos do perfil Th1, Th2 e para a citocina TGF-β em pacientes com LTA ativa

A Figura 8 mostra a comparação da expressão de mRNA para as citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-10, IL-4 por PBMC dos pacientes com LTA ativa (AT) frente as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L.(V).braziliensis* por 24h após normalização com o gene de referência (ΔCT) (Tabela 4).

Ao comparar a expressão de mRNA para TNF-α em pacientes com LTA ativa sob estímulo de ambas frações antigênicas de *Leishmania (V.) braziliensis*, o antígeno insolúvel (ΔCT=11,85±2,123) promoveu expressão 0,46 vezes maior de TNF-α em relação ao antígeno solúvel (ΔCT=12,96±3,707) (P = 0,005). Considerando a citocina IFN-γ, o antígeno insolúvel (ΔCT=11,9±4,41) resultou em uma expressão 0,19 vezes maior dessa citocina em pacientes com LTA ativa em relação ao antígeno solúvel (ΔCT=14,33±3,74) (p = 0,0004) (Tabela 4).

Ao observar a expressão das citocinas IL-10, TGF-β e IL-4 em pacientes com LTA ativa frente sob estímulo de ambas frações antigênicas, não houve diferença significativa entre os eles (p>0,05 (Tabela 4).

Figura 8 - Comparação da expressão gênica para IFN-γ, TNF-α, TGF-β, IL-10, IL-4 em PBMC de pacientes com LTA ativa frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.).braziliensis*



Nota: As células foram estimuladas com os antígenos solúvel (AgSol, 1,25µg/ml) e insolúvel (AgIns, 2,5µg/ml) de *Leishmania (V.) braziliensis* por 24h. A letra grega ω (ômega) representa as comparações com diferença estatística significativa entre os pacientes frente a estímulo com o antígeno solúvel (barra vertical preta) e pacientes frente a estímulo com antígeno insolúvel (barra vertical cinza). As barras verticais representam o desvio padrão.

Tabela 4 - Valores de expressão referente ao mRNA de citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-10, TGF-β e IL-4 de pacientes com LTA ativa comparados ao grupo controle (RQ1) e comparação da expressão das citocinas citadas no grupo de pacientes frente aos antígenos solúvel e insoluvel *de L(V.)braziliensis*

Citocinas	PHA			AgSol			AgIns			
TNF-α	ΔCT	ΔΔCT	RQ1	ΔCT	ΔΔCT	RQ1	ΔCT	ΔΔCT	RQ1	RQ2
AT	12,07	-1,26	2,4	12,96	-2,78	6,89	11,85	-3,1	8,58	0,46
CT	13,34	--	--	15,75	--	--	14,95	--	--	
IFN-γ										
AT	11,10	-3,56	11,78	14,33	-1,97	3,92	11,90	-7,33	160,35	0,19
CT	14,66	--	--	16,30	--	--	19,23	--	--	
IL-10										
AT	10,55	-2,76	6,78	10,58	-2,83	7,09	10,17	-3,15	8,91	0,75
CT	13,31	--	--	13,40	--	--	13,33	--	--	
IL-4										
AT	12,74	-5,55	46,82	11,20	-1,92	3,79	9,22	-9,25	609,17	0,25
CT	18,29	--	--	13,12	--	--	18,47	--	--	--
TGF-β										
AT	9,61	2,95	7,7	11,16	-2,02	4,06	11,53	-1,19	2,29	1,29
CT	12,39			12,93			12,66			

Nota: RQ = Quantidade Relativa; AT = pacientes com lesão ativa; CT = grupo controle; PHA = fitohemaglutinina; AgSol = antígeno solúvel; AgIns = antígeno insolúvel; RQ1 = Controle como grupo calibrador; RQ2 = AgIns AT como grupo calibrador (*comparação entre antígenos). Os valores hachurados em cinza são estatisticamente significativos em relação ao grupo calibrador.

5.4. Correlação entre a expressão gênica das citocinas o perfil Th1, Th2 e para a citocina TGF-β em pacientes com LTA ativa frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis*

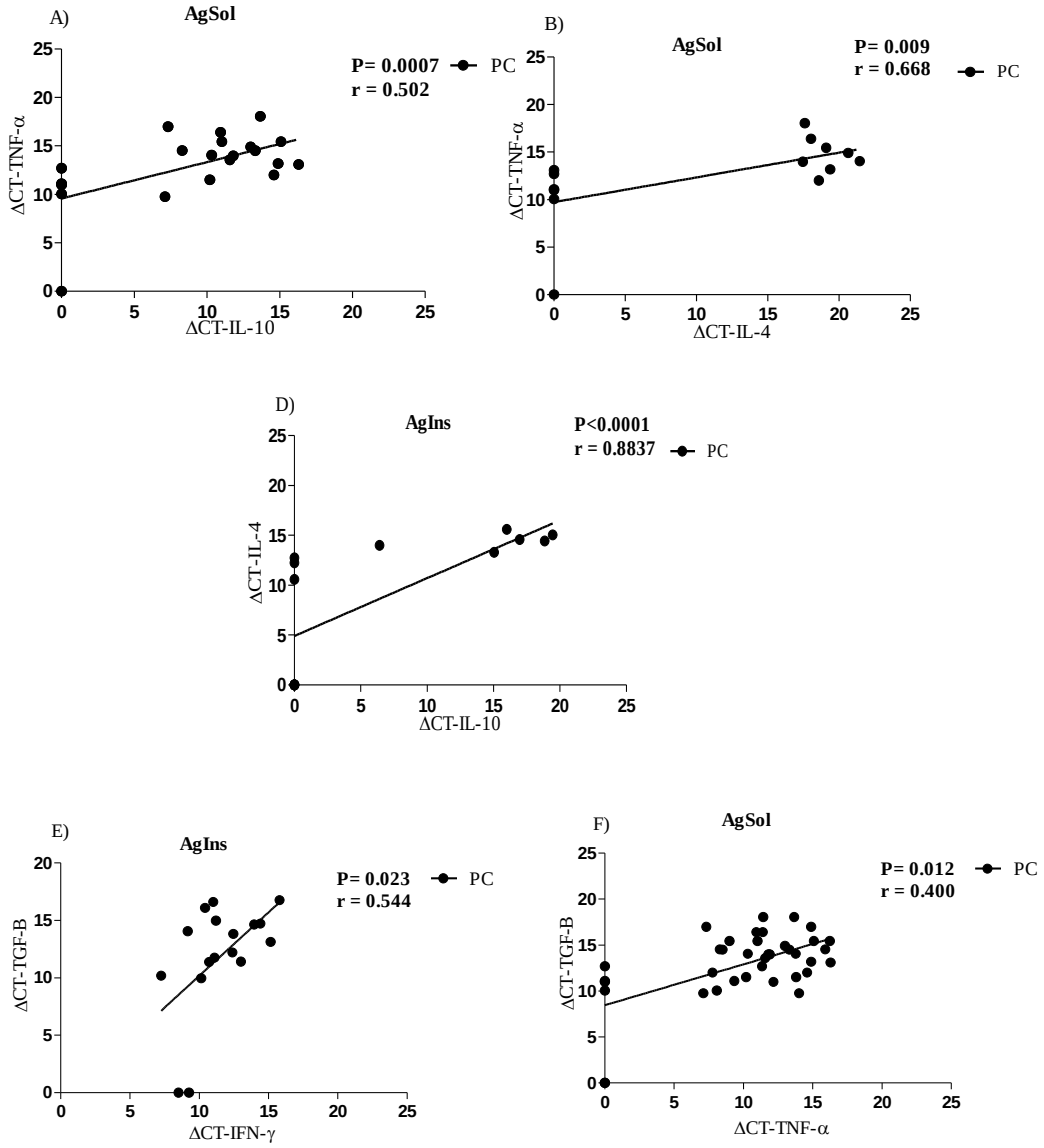
Para verificar a possível existência de associações entre os perfis Th1, Th2 e Th3, foi observada as correlações da expressão gênica das citocinas, sendo consideradas as definidoras de cada perfil. Foram avaliadas as comninações: IFN-γ x IL-10, TNF-α x IL-10, IFN-γ x IL-4 e TNF-α x IL-4, TGF-β x IFN-γ e TGF-β x TNF-α. Foram avaliados também as correlação entre citocinas do mesmo perfil: TNF-α x IFN-γ e IL-10 x IL-4.

Ao avaliar a expressão das citocinas TNF-α e IL-10 foi observada correlação significativa e positiva em relação ao antígeno solúvel de *L.(V.)braziliensis* (P=0.0007; r= 0.502). Considerando as citocinas TNF-α e IL-4 foi observado correlação positiva com diferença significativa em relação ao antígeno solúvel *L.(V.)braziliensis* (P=0.0090; r=0.668) (Figura 9). Considerando a expressão das citocinas TGF-β e IFN-γ foi observado correlação positiva e significativa entre essas citocinas em relação ao antígeno insolúvel (P=0.0238; r=

0.544) do parasita. Em relação a expressão de TGF-β e TNF-α (P= 0.012;r= 0.400) verificou-se correlação positiva e significativa em relação ao antígeno solúvel de *L(V.)braziliensis.*

Em relação a expressão das citocinas IL-10 e IL-4 foi verificada correlação positiva com diferença significativa em relação ao antígeno insolúvel *L.(V.)braziliensis* (P<0.0001; r=0.883)(Tabela 5).

Figura 9 - Correlação entre a expressão gênica de citocinas do perfil Th1 e Th2 em pacientes com LTA ativa: A (TNF-α x IL-10); B (TNF-α x IL-4), D (IL-10 x IL-4), E (TGF-β x IFN-γ) e F (TGF-β x TNF-α) frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis*



Nota: As células foram estimuladas com antígenos solúvel (AgSol, 1,25µg/ml) e insolúvel (AgIns, 2,5µg/ml) de *Leishmania (V.) braziliensis* por 24h. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de P foram menores que 0,05

Tabela 5 - Correlação entre a expressão gênica de citocinas do perfil Th1 e Th2 (IFN-g x IL-10, TNF-α x IL-10, IFN- γ x IL-4, TNF-α x IL-4, TNF-α x IFN-γ, IL-10 x IL-4 de pacientes com LTA ativa frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis*

Pacientes com LTA ativa	AgSol		AgIns	
Correlação	P	r	P	r
IFN-γ x IL-10	0.670	-0.085	0.544	-0.121
TNF-α x IL-10	0.0007	0.502	0.238	0.268
IFN-γ x IL-4	0.647	-0.115	0.691	0.100
TNF-α x IL-4	0.009	0.668	0.239	0.323
TNF-α x IFN-γ	0.092	0.376	0.114	0.354
TGF-β x IFN-γ	0.105	0.406	0.0238	0.544
TGF-β x TNF-α	0.012	0.400	0.249	0.295
IL-10 x IL-4	0.243	0.333	<0.001	0.8837

Nota: As células foram estimuladas com antígenos solúvel (AgSol, 1,25µg/ml) e insolúvel (AgIns, 2,5µg/ml) de *Leishmania (V.) braziliensis* por 24h. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de P foram menores que 0,05.Os valores hachurados em cinza são estatisticamente significativos; r=coeficiente de correlação de Spearman

5.5. Correlação entre os dados clínicos dos pacientes e a expressão de citocinas do perfil Th1 e Th2

A expressão das citocinas do perfil Th1 e Th2 também foi correlacionada considerando os dados clínicos de cada paciente. Dentre os dados clínicos, o tempo de desenvolvimento da lesão, tamanho e número de lesões bem como a resposta a Intradermorreação de Montenegro foram avaliados.

Ao analisar a IDRM em relação ao tempo de lesão foi observada correlação positiva com diferença significativa (P=0.026; r=0.453) (Tabela 6). Ao verificar a IDRM em relação a expressão de IFN-γ foi observado correlação negativa com diferença significativa em relação ao antígeno insolúvel *de L.(V).braziliensis* (P=0,042, r=0,-418) (Tabela 6). Ao verificar a correlação das citocinas em relação ao tamanho e ao tempo de lesão foi verificada apenas correlação negativa com diferença significativa ao comparar a expressão de IL-4 com o tempo de lesão em relação ao antígeno solúvel (P=0.012 e r= -0.574) e insolúvel (P= 0.0209 e r=-0.539) de *L.(V).braziliensis* (Tabela 7).

Tabela 6: Correlação entre os dados clínicos dos pacientes com LTA ativa e entre os dados clínicos e a expressão gênica de citocinas do perfil Th1 (TNF-α e IFN-γ): IDRM x tempo de lesão; IDRM x tamanho de lesão; IDRM x número de lesões; IDRM x IFN- γ e IDRM x TNF-α. frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis*

Pacientes com LTA ativa			AgSol			AgIns	
Correlação	P	r	Correlação	P	r	P	r
IDRM x Tempo de lesão	0.026	0.453	IDRM x IFN-γ	0.111	-0.333	0.042	-0.418
IDRM x Tamanho de lesão	0.491	-0.147	IDRM x TNF-α	0.800	-0.06	0.539	-0.150
IDRM x Número de lesões	0.241	0.248					

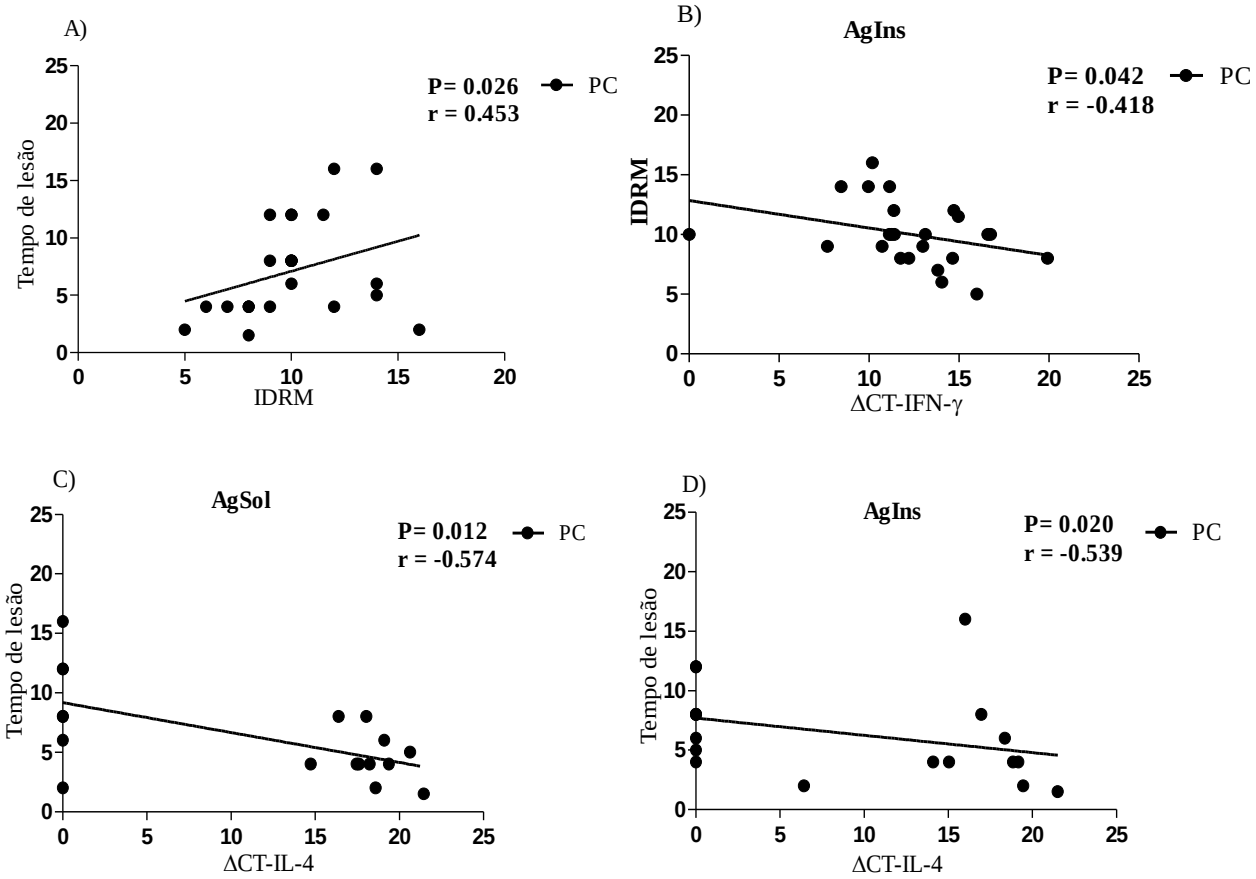
Nota: As células foram estimuladas com antígenos solúvel (AgSol, 1,25µg/ml) e insolúvel (AgIns, 2,5µg/ml) de *Leishmania (V.) braziliensis* por 24h. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de P foram menores que 0,05. Os valores hachurados em cinza são estatisticamente significativos; r=coeficiente de correlação de Spearman

Tabela 7 - Correlação entre a expressão gênica das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-10 e IL-4 e dos dados clínicos dos pacientes com LTA: tempo e tamanho de lesões frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L(V.)braziliensis*.

Pacientes com LTA ativa	AgSol		AgIns	
Correlação	P	r	P	r
IFN-γ x Tamanho de lesão	0.615	0.108	0.632	0.105
TNF-α x Tamanho de lesão	0.790	0.067	0.890	-0.033
IL10 x Tamanho de lesão	0.285	-0.227	0.711	-0.079
IL-4 x Tamanho de lesão	0.233	0.296	0.093	0.407
IFN-γ x Tempo de lesão	0.758	-0.062	0.884	0.029
TNF-α x Tempo de lesão	0.737	-0.077	0.986	-0.003
IL10 x Tempo de lesão	0.292	-0.210	0.270	-0.219
IL-4 x Tempo de lesão	0.012	-0.574	0.0209	-0.539

Nota: As células foram estimuladas com antígenos solúvel (AgSol, 1,25µg/ml) e insolúvel (AgIns, 2,5µg/ml) de *Leishmania (V.) braziliensis* por 24h. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de P foram menores que 0,05. Os valores hachurados em cinza são estatisticamente significativos; r=coeficiente de correlação de Spearman

Figura 10 - Correlação entre os dados clínicos de pacientes e a expressão de citocinas do perfil Th1 : A (IDRM x Tempo de lesão em meses), B (IDRM x IFN-γ) e C (IL-4 x tempo de lesão) de pacientes com LTA ativa



Nota: As células foram estimuladas com antígenos solúvel (AgSol, 1,25µg/ml) e insolúvel (AgIns, 2,5µg/ml) de *Leishmania (V.) braziliensis* por 24h. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de P foram menores que 0,05.

6. DISCUSSÃO

A LTA é uma doença que apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas. Em humanos, a infecção pode ser subclínica ou pode variar desde lesões localizadas, disseminadas, difusas até as agressivas e multilantes lesões mucocutâneas (CARVALHO et al., 2012; SOUZA et al., 2012). Sabe-se, no entanto, que essas manifestações clínicas são influenciadas por vários fatores que incluem a espécie do parasita e do vetor, a quantidade de parasita inoculado, o sítio de inoculação, a constituição genética e resposta imune do hospedeiro (BRELAZ et al., 2012; CASTELLANO et al., 2009; CHOI; KROPT, 2009;REIS et al., 2009).

Estudos foram desenvolvidos utilizando modelos animais e humanos na busca de compreender os mecanismos imunológicos responsáveis pelo desenvolvimento da LTA (PISCOPO; MALLIA, 2006; REIS et al., 2006; ROBERTS, 2006). No entanto, ainda não existe uma relação bem estabelecida desses mecanismos. Sendo assim, a investigação da resposta imune em humanos e a associação dos perfis imunológicos encontrados aos dados clínicos dos pacientes são essenciais na busca de novas estratégias para intervenções imunológicas e vacinas.

Observando a população do presente estudo, verificou-se que 21 pacientes foram provenientes de área endêmica da Zona da mata de PE. Foi observado que a doença atingiu 25 pacientes adultos, com média de idade de aproximadamente 31 anos e 2 pacientes são crianças. A LTA, nesse estudo, afetou 16 mulheres e 11 homens, sendo 11 pacientes trabalhadores da zona rural. Em geral, essa doença está associada a áreas rurais, sobretudo nas atividades de exploração e desmatamentos em florestas e em atividades agrícolas (RODRIGUES et al., 2006).

Ao observar as formas clínicas dos pacientes desse estudo, 24 pacientes apresentaram a forma cutânea localizada com lesões ulceradas em área descobertas do corpo. A existência das lesões nas áreas descobertas do corpo, normalmente membros superiores e inferiores, pode ser explicada pelas atividades ocupacionais em áreas rurais. Estudos anteriores reportam a grande ocorrência da forma cutânea localizada em Pernambuco, bem como em outros Estados (ANDRADE et al., 2005; BRANDÃO-FILHO et al., 1999; RODRIGUES et al., 2006). Além disso, autores afirmam que a leishmaniose cutânea localizada é a manifestação clínica prevalente no Brasil e ocorre principalmente em infecções por *L.(V.) braziliensis* (GOLLOB et al., 2008; NOGUEIRA,2008).

O tempo de evolução da doença, contado desde o surgimento da lesão até a procura do paciente pelo núcleo de vigilância em saúde dos municípios variou de 10 dias a 4 meses apresentando uma média de 7,37 ± 4,10 semanas. Em 48,15% (13, dos 27 pacientes) apresentaram tempo de lesão inferior a 60 dias. Esses dados foram similares a dados encontrados em estudos anteriores, o que reflete o aumento do conhecimento dos pacientes sobre a existência da doença nos últimos anos (ANTONELLI et al.,2005; BASANO; CAMARGO, 2004; DA CRUZ et al., 2002; RODRIGUES et al, 2002)

Estudos mostram que devido ao amplo espectro de manifestações clínicas, espécies envolvidas e similaridade com outras enfermidades, o diagnóstico preciso é fundamental (GONTIJO; CARVALHO, 2003; REINTHINGER et al.,2007; POURMOHAMMADI et al, 2010). Como não há um teste laboratorial considerado padrão-ouro, o diagnóstico da doença é baseado em padrões clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (ANDRADE et al.,2009; GONTIJO; CARVALHO, 2003; REIS et al., 2006). Os pacientes desse estudo tiveram seu diagnóstico confirmado por critérios clínicos, epidemiológicos e por exames laboratoriais positivos. Os exames laboratoriais foram realizados em colaboração com pesquisadores pertencentes ao Serviço de Referência em Leishmaniose do CPqAM/Fiocruz-PE e incluíram: IDRM, Pesquisa Direta, IFI e PCR convencional. Por motivos operacionais, alguns dos pacientes não puderam ser diagnosticados por todos os métodos citados.

A IDRM apresentou 100% de positividade nos pacientes do estudo (25, dos 25 pacientes avaliados). Esses dados estão de acordo com dados obtidos por outros autores que reportaram uma positividade em cerca de 90% dos casos (BRASIL, 2007; REIS et al., 2008; NOGUEIRA, 2008; VEGA-LOPEZ, 2003). Uma reação positiva deve ser considerada com cautela como diagnóstico principalmente em indivíduos moradores de área endêmica, visto que pode ser interpretada como leishmaniose anterior, leishmaniose em atividade, aplicação anterior de antígeno de IDRM, exposição ao parasito sem doença (infecção), hipersensibilidade ao diluente do teste ou reação cruzada com outras doenças (doença de Chagas e Leishmaniose Visceral). Esse é um teste útil, no entanto, para estudos epidemiológicos e para determinar prevalência da infecção em uma região (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL,2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010; OMS, 2010; REIS et al., 2008).

A IFI apresentou resultado positivo em 61,9% dos pacientes analisados (13 dos 21 pacientes avaliados). Esses dados estão de acordo com outros estudos em que observaram alta sensibilidade da técnica em relação aos pacientes diagnosticados (REIS et al., 2008). Estudos mostram que a IFI apresenta sensibilidade de 71% nas formas cutâneas e 100% nas formas

mucosas. Essa ferramenta nas lesões ulceradas por *L. (V.) braziliensis* apresenta uma sensibilidade em torno de 70% no primeiro ano da doença e, após o tratamento ou cura, os títulos de anticorpos podem cair ou desaparecer em alguns meses. A positividade desse exame está associada ao tempo de evolução da doença, espécie de *Leishmania* envolvida e experiência do técnico responsável (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Em pacientes com lesões recente (1 a 6 meses de lesão) é comum a negatividade sorológica. Nos casos positivos, os títulos de anticorpos são significativamente mais elevados naqueles que apresentam múltiplas lesões, refletindo a maior antigenicidade induzida pelo maior número de parasitas (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Essa técnica, contudo, pode apresentar limitações, pois não correlaciona o nível de anticorpos circulantes com o estágio da doença. Além disse, podem ocorrer reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae (ROCHA et al., 2002; 2006).

Outra metodologia utilizada para o diagnóstico dos pacientes foi a PCR convencional. No presente trabalho, observamos 77,27% de resultados positivos (17, dos 22 pacientes avaliados). Estudos realizados por Bensoussan et al. (2006) demonstraram que ensaios utilizando PCR convencional se mostraram muito mais sensíveis que métodos parasitológicos clássicos de diagnóstico, com positividade variando de 53 a 98,7%. Essa técnica oferece 100% de sensibilidade e acima de 90% especificidade, sendo capaz de detectar baixas quantidades de parasitos na infecção (AMEEN, 2010; POURMOHAMMADI et al, 2010 REIS et al., 2008).

Em relação à pesquisa direta, 51,85% pacientes analisados apresentaram resultados positivos (14, dos 25 pacientes realizados). Esse teste parasitológico não é capaz de determinar a espécie do parasita, visto que todas as espécies de *Leishmania* são morfologicamente idênticas (BENSOUSSAN et al., 2006; VEGA-LÓPEZ, 2003). FABER et al. (2003), utilizando esta técnica, alcançaram sensibilidade e especificidade variáveis, o que pode ser explicado pela escassez parasitária na lesão causada por *L. (V.) braziliensis*, evento característico de evolução da doença. Vale ressaltar que no referido teste quanto maior o tempo de duração da lesão, menor a probabilidade de se encontrar parasitas. A positividade desta técnica está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses(AMEEN, 2010; ANDRADE et al., 2009).

Por dificuldades operacionais os pacientes 04, 07 e 16 apresentaram apenas o resultado da Intradermorreação de Montenegro não obedecendo aos critérios de inclusão iniciais desse estudo. No entanto, foi verificado que esses pacientes responderam ao tratamento utilizando o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), confirmando dessa

forma a presença da LTA. De acordo com o Ministério da saúde, pacientes que apresentam apenas Intradermorreação de Montenegro positiva podem ser submetidos ao tratamento específico para LTA (BRASIL, 2007).

O estudo da resposta imune celular e a determinação do perfil de citocinas tanto em modelos animais como em humanos tem sido determinado através da aplicação de vários métodos quantitativos e semi-quantitativos. Essas metodologias podem variar desde a quantificação da secreção de citocinas através da técnica de ELISA em sobrenadante de cultura celular, detecção de múltiplas citocinas em uma única amostra através da Citometria de fluxo e da quantificação da expressão gênica para citocinas em células humanas através da PCR quantitativa em tempo real (GOLLOB et al., 2008; RADKE et al., 2012).

As citocinas são proteínas solúveis reguladoras, incluindo as interleucinas, fatores de necrose tumoral, quimiocinas e fatores estimuladores de colônias. Elas são secretadas por leucócitos e outras células e atuam sobre o comportamento das células do sistema imune e modulação das reações inflamatórias, crescimento celular e na transdução de sinal. As citocinas podem reagir em cascatas com outras citocinas, de maneira sinérgica ou antagônica, conduzindo a uma maior ou menor produção ou a secreção de novas citocinas. A quantificação das citocinas é, portanto, considerada como um importante meio de estudar a função específica das células do sistema imunológico (HÄRTEL, 2001; RADKE et al, 2012;.

A PCR quantitativa em tempo real é uma técnica amplamente utilizada para quantificar as citocinas a partir das células, tecidos e biópsias. Esse método permite quantificar raros transcritos e observar pequenas mudanças na expressão gênica permitindo a detecção direta de produtos de PCR durante a fase exponencial da reação. Dessa forma, combinando amplificação e detecção em uma única etapa sendo, essa técnica apresenta fácil execução além de fornecer resultados rápidos, precisos e confiáveis (PFAFFL,2001). Estudos têm mostrado a aplicação dessa técnica para quantificação da expressão de mRNA de citocinas como um parâmetro para observar a ativação da resposta imune celular (HARTER,2001). A PCR quantitativa em tempo real depende da eficiência dos ensaios de transcrição reversa, de amplificação específica através PCR quantitativa em tempo real para cada alvo, e a garantia de que os iniciadores e sondas não detectaram DNA genômico (CÁCERES-DITTMAR, 1993). As sondas utilizadas no presente estudo foram sondas MGB TaqMan® que se estendem sobre uma junção éxon-éxon, e dessa forma, caso o DNA genômico seja co-extraído com o RNA ele não será detectado como um *template* em uma reação de PCR quantitativa em tempo real. No entanto, poucos trabalhos têm analisado a

expressão de mRNA para citocinas na leishmaniose humana (CACERES-DITMAR et al.1993; ETTINGER, 2008).

Os linfócitos atuam produzindo citocinas biologicamente relevantes para a ativação de monócitos e macrófagos. Sabe-se que a resposta imune mediada por células apresenta papel fundamental na resposta do hospedeiro e que o tratamento de pacientes podem ser beneficiados pelas intervenções imunológicas caso o papel dos subconjuntos de linfócitos T e o papel das citocinas produzidas sejam estabelecidos (BRELAZ et al., 2012; BRITO, 2001 COUTINHO,1996; LEOPOLDO et al., 2006; REIS et al., 2009).

A produção de citocinas, utilizando-se estimulação antígeno-específica, foi avaliada por diferentes grupos em estudos anteriores através da técnica de ELISA. Castellano et al. (2009), Leopoldo et al. (2006), Da-Cruz et al. (2002), Coutinho et al. (1996), demonstraram que antígenos de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* íntegros ou sonicados eram capazes de induzir diferentes níveis de resposta imune celular, com a produção de citocinas em PBMC de pacientes.

Nesse contexto, embora os perfis Th1 e Th2 sejam frequentemente estudados, existindo uma dicotomia Th1/Th2 como indicador de resistência e susceptibilidade, não existe um padrão claro de resposta imune do perfil Th1 e Th2 frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis.* Dessa forma, observar o perfil de expressão gênica de citocinas de pacientes com LTA frente aos antígenos citados, bem como identificar os antígenos que induzem a resposta imune celular específica, é importante não só para entender o papel dos mediadores imunológicos no desenvolvimento da doença, bem como para identificar candidatos potenciais ao desenvolvimento de vacinas e imunoterapias.

No presente estudo, foi avaliado o perfil de expressão gênica das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-4 e da enzima iNOS em PBMC de pacientes com LTA ativa frente ao mitógeno PHA e as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L (V.) brazilensis* e a associação desse perfil a dados clínicos dos pacientes como tamanho, tempo de desenvolvimento e número de lesões, bem como resposta à IDRM.

Em relação a PHA, foi verificado expressão de mRNA para todas as citocinas, apresentando diferença significativa na expressão de mRNA para IFN-γ em pacientes quando comparados ao grupo controle. Não foi observado expressão da enzima óxido nítrico sintase em nenhum grupo analisado. A PHA, lectina de *Phaseolus vulgaris*, é um mitógeno policlonal que apresenta a propriedade de ativar e induzir a proliferação de linfócitos humanos *in vitro* (MACHADO JUNIOR el al, 2006). Dessa forma, tem sido amplamente utilizada em estudos *in vitro* de ativação dessas células. Esse mitógeno induz a mitose por um mecanismo que é

dependente de TCR e nem todas as células T sofrem esse processo (BRELAZ, et al., 2012; PAUL, 1999; REIS et al., 2009) Assim, as diferenças estatísticas não encontradas na expressão das citocinas podem ser explicadas por esse fato, ou seja, os mitógenos não estimularam a mitose igualmente nesses grupos. Esse resultado reflete, no entanto, a capacidade de PBMCs de pacientes e controles em expressarem mRNA para essa citocinas na presença de estímulo mitogênico. Esse tipo de análise é importante para avaliar a capacidade celular de resposta frente a antígenos inespecíficos, e serviu como controle positivo para o nosso estudo (SUNI et al., 2005).

Trabalhos anteriores, realizados por nosso grupo, com as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L(V.) braziliensis* demonstraram que o soro de pacientes com LTA ativa, pacientes pós-tratamento e pacientes curados espontâneamente foram capazes de reconhecer antígenos da fração antigênica solúvel (30 kDa) e insolúvel (19 kDa). Diante dos resultados, sugeriu-se que esses antígenos poderiam ser utilizados como testes diagnósticos (BRITO et al., 2000; 2001). Em outros trabalhos, também demonstramos o potencial de estimulação antigênica das frações solúvel e insolúvel de *L(V.) braziliensis*, e a sua capacidade de provocar linfoproliferação e estimulação da produção de citocinas Th1 e Th2 em PBMC de pacientes, mensuradas através de ensaios com incorporação de Timidina H_3 e ELISA (REIS et al., 2009; SOUZA et al., 2012; 2013).

Estudos recentes realizados pelo nosso grupo utilizando a técnica ELISA para mensurar a produção de citocinas, observou produção significativa de IFN-γ e TNF-α em sobrenadantes de cultura de PBMC de pacientes com LTA ativa frente as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L (V.) braziliensis* quando comparados aos controles e produção de IL-10 em todos os grupos, sem diferença significativa (SOUZA et al., 2012, 2013). Castellano et al (2009), também utilizando a técnica ELISA, observaram aumento significativo na produção das citocinas IFN-γ, TFN-α, IL-10 e IL-4 em sobrenadante de cultura de PBMC em pacientes com lesão ativa frente a antígeno de *L.(V) braziliensis*.

Coutinho et al. (1998), observaram perfil misto de produção de citocinas (IFN-γ, IL-4) em PBMC de pacientes com LCL frente ao antígeno total de *L(V.)braziliensis* através da técnica ELISA. Reis et al. (2009), através da técnica ELISA, observaram aumento na produção de IFN-γ em PBMC de pacientes com LTA antes do tratamento quando comparados a grupo controle frente a estímulo com antígeno solúvel de *L (V.) braziliensis*

Baratta-Masini et al.(2007), através da citometria de fluxo, observaram observaram um perfil misto através da produção de citocinas do perfil Th1 (IFN-γ e TNF-α) e do perfil Th2 (IL-10 e IL-4) em PBMC de pacientes com LCL frente ao antígeno solúvel de

L(V.)braziliensis quando comparados ao grupo controle . Foi observado, no entanto, aumento na produção das citocinas IFN-γ e TNF-α e aumento na concentração de nitrato e nitrito no plasma de pacientes com LC. Bottrel (2001), através da técnica citometria de fluxo, observou aumento na produção de IFN-γ e TNF-α em PBMC de pacientes frente ao antígeno solúvel *L(V.)braziliensis* quando comparados ao basal. Cárceres-Dittimar et al.(1993), através da técnica PCR em tempo real observou elevado nível de mRNA para IFN-γ e TNF-α e baixo níveis de expressão de mRNA para as citocinas IL-10 e IL-4 em pacientes com Leishmaniose cutânea localizada. Borreau et al. (2001) observou, através da técnica PCR em tempo real, expressão de mRNA para IFN-γ em pacientes com LCL causada por *L.guyanensis.*

IFN-γ e TNF-α, citocinas do perfil Th1, apresentam importante papel no controle de infecção por *Leishmania*. Essas citocinas atuam na ativação de macrófagos induzindo a expressão da iNOS para produzir NO responsável pela destruição de microrganismos intracelulares (CUMMINGS,2010; CASTELLANO et al., 2009; ROGER, 2002). As citocinas IL-10 e IL-4 em pacientes com LC está associada a desativação macrófágica e inibição de linfócitos do perfil Th1 e consequentemente progressão da doença (BARATTA-MASINI et al., 2007; DA CRUZ, 2002).

O presente trabalho verificou que as células dos pacientes com LTA frente ao antígeno solúvel de *L.(V) braziliensis* obtiveram expressão de mRNA para as citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-10, com expressão significativa das citocinas IFN-γ e TNF-α em pacientes quando comparados ao grupo controle. Não foi observado expressão de iNOS nos grupos analisados. Ao observar a expressão gênica dessas citocinas em relação ao antígeno insolúvel também foi verificada expressão de todas elas, com diferença significativa na expressão de IFN-γ, TNF-α e IL-4. Não foi observada expressão de iNOS nos grupos analisados. Dessa forma, podemos sugerir que o predomínio da resposta Th1 é necessário para o controle do parasita e cura da lesão, enquanto que a simultânea presença de citocinas IL-4 e IL-10 e provavelmente outras citocinas regulatórias como TGF-β podem contribuir para o escape do parasita, persistência da lesão e do estímulo proinflamatório (CASTELLANO et al.., 2009).

Ao correlacionar a expressão gênica das citocinas foi verificado correlação positiva com diferença significativa entre as citocinas TNF-α e IL-10 em relação ao antígeno solúvel de *L(V.).braziliensis*. Díaz et al. (2010), avaliou as inter-relações entre a expressão gênica de fatores de transcrição que regulam a diferenciação de células T e a expressão gênica e secreção de citocinas através de PCR quantitativa em tempo real, e produção de citocinas através da técnica CBA (Cytometric Bead Array CBA) e citometria de fluxo, respectivamente durante a infecção assintomática, doença crônica, recidivas e em pacientes que apresentaram

resolução das últimas manifestações clínicas as quais foram acometidos. Esse trabalho observou, sem fazer distinção da característica clínica da doença, correlação positiva na produção de citocinas TNF-α e IL-10. Antonelli et al. (2004), utilizando a citometria de fluxo para identificar diretamente a subpopulação de linfócitos produzindo citocinas imunorregulatórias em LC em humanos causada por *L (V.) braziliensis* notou que a produção de IL-10 por linfócitos $CD4^+$ não está associada com baixa produção de IFN-γ e TNF-α. Ao invés disso, observou-se uma correlação positiva indicando a coordenada regulação na frequência de células T produzindo citocinas capazes de ativar a atividade leishmanicida e de produzir citocinas regulatórias . Essa produção de IL-10 pode ser de suma importância na imunorregulação da forte resposta proinflamatória exercida pelas citocinas IFN-γ e TNF-α contra *Leishmania,* pois embora essa citocina esteja envolvida no controle da infecção, sua superprodução pode contribuir para o dano tecidual e a formação da úlcera (ANTONELLI, et al., 2004; CASTELLANO et al., 2009; REIS et al., 2009). Dessa forma, esses dados suegrem que os pacientes do presente estudo estejam apresentando uma imunoregulação ativa da sua resposta inflamatória.

Ao comparar a expressão gênica para as citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-4 e da enzima iNOS frente aos antígenos solúvel e insolúvel de *L.(V) braziliensis* no grupo de pacientes, observou-se que a fração antigênica insolúvel estimulou uma maior expressão gênica as citocinas IFN-γ, TNF-α. Não foi observado diferença na expressão de IL-10 e IL-4 frente as frações antigênicas utilizadas. Telino et al. (2005), buscando identificar moléculas antigênicas para a identificação de novas subunidades candidatas a vacinas e alvos para a imunoterapia avaliou a capacidade de obter uma resposta imune específica em PBMCs de pacientes com LTA ativa frente ao antígeno total de *L. (V.) braziliensis* e de *L.(L.) amazonensis,* e frente as frações antigênicas solúvel e particulada de *L.(L.) amazonensis* utilizando a técnica de ELISA. Esse estudo verificou que todos os antígenos foram capazes de estimular a produção de IFN-γ. Em relação aos antígenos de *L.(L.) amazonensis* observou que houve uma maior produção de IFN-γ e IL-10 frente ao antígeno total quando comparado com o antígeno solúvel do parasita e que não foi observado diferença na produção dessas citocinas quando comparados ao antígeno particulado de *L.(L.) amazonensis.* Por ser constituído predominantemente por fragmentos de membrana, o antígeno total de *L.(L.) amazonensis* foi capaz de induzir de maneira mais eficiente a resposta imune inata e adaptativa quando comparados a fração antigênica solúvel do parasita formado por grânulos lipídicos e proteínas do parasita.

Em relação as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* utilizadas no presente estudo sugere-se que o antígeno insolúvel, constituído de fragmentos de membrana do parasita, seja mais imunogênico que o solúvel, formado por proteínas do citoplasma do parasita, o que justifica a diferença de expressão gênica entre as formas antigênicas. Além disso, pode haver nesses pacientes um maior número de populações celulares com memória imunológica para os componentes do antígeno insolúvel de *L.(V).braziliensis.* Dessa forma, sugere-se que a fração antigênica insolúvel seja uma possível molécula antigênica para a identificação de novas subunidades candidatas a vacinas e alvos para a imunoterapia, sendo necessários, no entanto, estudos complementares visando entender quais moléculas, dentro dessa fração, estão sendo capazes de estimular uma resposta imune específica em pacientes com LTA ativa.

Durante a infecção por *Leishmania*, os macrófagos funcionam como importantes células efetoras no controle e eliminação dos parasitos. A produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos induz as células T e NK a produzirem IFN-γ. Sob ação desta citocina, os macrófagos, produtores de TNF-α, são ativados e induzidos a liberar óxido nítrico (BARATTA-MASINI et al., 2007; REIS et al.,2009; KEDZIERSKI, 2010)

A enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS-II) é ativada através de estímulos imunológicos como as citocinas IFN-γ e TNF-α. Essas citocinas atuam induzindo a expressão de óxido nítrico sintase que atua na oxidação de um dos dois nitrogênios da L-arginina que é convertida em L-citrulina e produção de NO, importante agente microbicida responsável pela morte de parasitas. Este gás inorgânico possui função efetora na resposta imune contra patógenos, e por ser uma molécula instável, decompõe-se entre seis e trinta segundos. A partir deste evento surgem produtos finais mais estáveis, como o nitrito (NO2-). Este tem sido utilizado na detecção indireta do NO através da reação colorimétrica de Griess (DUSSE, 2003; HORTA et al.2012).

Baratta-Masini et al.(2007), através do método de Griess, observou aumento de nitratos e nitrito no plasma de pacientes com Leishmaniose cutânea localizada. Outro estudo anterior analisando biópsias de pacientes com LCL através da técnica de imunohistoquímica observou aumento expressão da enzima iNOS em biópsias de pacientes com pequeno número de parasitas. Este estudo anterior realizado pelo mesmo grupo analisando biópsias de pacientes com LTA *in situ* também observou aumento da produção de IFN-γ e TNF-α em relação a produção de IL-4 , além de baixos níveis de IL-5 e IL-10 (QADOUMIN et al., 2002). Considerando o fato que essas citocinas descritas promovem uma ampliação na-

regulação de iNOS, esse estudo sugere que o aumento da expressão da enzima iNOS na lesão desses pacientes tenha sido mediado por essas citocinas.

Green et al. (1994), realizaram ensaios *in vitro* analisando a atividade antimicrobiana de macrófagos contra *L. major* e identificação de quais citocinas estão envolvidas na regulação da produção de NO. Esse trabalho anterior observou que o parasita induz a ativação do gene para TNF-α e a produção dessa citocina é aumentada pela presença de IFN-γ. TNF-α atua através de sinal autócrino para ampliar a indução da ação de IFN-γ em induzir a produção de NO. Em contrapartida, o parasita atua na ampliação da regulação da produção de TGF-β, que atua bloqueando a ação de IFN-γ sobre a produção de NO. No entanto, a indução de TGF- β ou TNF-α depende da presença e quantidade de IFN-γ no momento da infecção.

No presente estudo, foi observado aumento da expressão de IFN-γ e TNF-α, no entanto não se observou expressão de iNOS em nenhum grupo analisado. Esse achado pode ser explicado pelo fato de no momento da cultura ter havido aumento da produção de óxido nítrico e esse aumento pode ter exercido um realimentação negativa, um mecanismo autorregulatório de inibição da enzima para que não haja produção de NO em excesso e lesão tecidual (BOGDAN, 2001). Outro aspecto a ser considerado é o fato de a *Leishmania* ter a capacidade de direcionar a diferenciação das células T para uma resposta do tipo Th2, levando à persistência da infecção (REIS et. al., 2006). Dessa forma, a expressão de citocinas do perfil Th2 (IL-10 e IL-4) e a presença da citocina TGF-β, pertencente ao perfil Th3, podem atuar na inibição da diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ do perfil Th1 e na inibição da produção de IFN-γ e TNF-α, consequentemente, inibindo a expressão da iNOS, que por isso não foi detectada nesse estudo (ANTONELLI et al., 2004; COUTINHO,1998; DA CRUZ et al., 2002; BARATTA-MASINI et al., 2007; GREEN,1994; BOGDAN, 2001). Além disso, a citocina IL-4 promove a ativação alternativa de macrófagos e indução da produção de arginase I (BITTAR et al., 2007). Essa enzima compete pelo mesmo substrato da iNOS e metaboliza a L-arginina em uréia e no aminoácido ornitina. Esse aminoácido é a fonte intracelular para síntese de poliaminas necessárias para o crescimento do parasita (HORTA et. al., 2012; CHOI-KROPT, 2009). Dessa forma, a presença de IL-4 e a produção de arginase I pode ter influenciado na expressão da iNOS.

Em relação a IL-10, foi observado expressão de mRNA para essa citocina em ambos os grupos frente as frações antigênicas solúvel e insolúvel *de L.(V).braziliensis* sem diferença significativa entre eles. Embora a resposta Th1 seja benéfica, o controle da resposta inflamatória é essencial para a cura da doença. A produção de IL-10, inicialmente relacionada apenas ao favorecimento da sobrevivência do parasita no hospedeiro através da desativação

macrófagos infectados pelo parasita e inibição da produção de citocinas do perfil Th1, pode representar um contrabalanço necessário para a resolução da doença (ANTONELLI et al., 2005; CASTELLANO et al., 2009;BARATA-MASINI et al.,2007; REITHINGER,2007; GOMES-SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2012; 2013).

Considerando a citocina IL-4 foi observada expressão significativa dessa citocina em pacientes quando comparados aos controles frente a fração antigênica insolúvel de *L(V.)brasiliensis*. A IL-4, citocina que define o perfil Th2, apresenta importante papel na desativação de macrófagos e na regulação da indução de células Th2, em adição à inibição de células Th1 (BARATTA-MASINI et al., 2007; KAMALI-SARVESTANI, 2006). A IL-4 inibe o desenvolvimento da resposta Th1 via numerosos mecanismos, incluindo a regulação negativa da cadeia IL12Rβ2 e da função regulatória do fator de transcrição T-bet, que controla a expressão de IFN-γ (.KAMALI-SARVESTANI, 2006). Além disso, a IL-4 demonstrou aumentar o crescimento das *Leishmanias* induzindo a via da arginina através do metabolismo desse aminoácido pela enzima arginase, levando a produção de poliaminas favorecendo o crescimento *da Leishmanian* (BITTAR et al., 2007; KAMALI-SARVESTANI, 2006) e foi relacionada com a persistência das lesões em pacientes infectados com *L. major*, sendo produzida principalmente por T CD4+ (BOTTREL et al, 2001). Dessa forma, os dados encontrados no presente estudo sugerem que parte da população desse estudo está permitindo a multiplicação parasitária e o desenvolvimento da doença.

Não foi observado correlação entre a resposta Th1 e Th2 em relação ao tamanho de lesão. Em relação ao tempo de lesão foi observado correlação negativa com diferença significativa em relação a expressão de IL-4.

Louzir et al. (1995) analisando a resposta imune local em pacientes infectados com *L.major* detectou IL-4 em estágios iniciais de desenvolvimento da doença. Bourreau et al (2003) analisando a expressão gênica de citocinas do perfil Th1/Th2 em biópsias de pacientes com LCL ativa causada por *L.guyanensis* através de RT-PCR semi-quantitativa correlacionou o tempo para o desenvolvimento da lesão em relação ao perfil de expressão de citocinas do perfil Th1 e Th2. Esse estudo observou que em infecções recentes, média de 25.5 dias, há o predomínio de resposta Th2 em biópsias desses pacientes infectados com *L.guyanensis*. Em biópsias em que há o desenvolvimento equivalente da resposta Th1 e Th2, o tempo de desenvolvimento da lesão é intermediário, 30 dias. Assim, os pacientes com LCL em infecções por *L. guyanensis* apresentaram uma transitória resposta Th2 em estágios iniciais da infecção e posteriormente o desenvolvimento de uma resposta Th1.

Baratta-Masini et al, (2007) avaliando o perfil de citocinas, utilizando a citometria de fluxo, em pacientes com Leishmaniose cutânea localizada em diferentes tempos de desenvolvimento de lesão após estimulação antigênica in vitro com antígeno solúvel de *L(V.)braziliensis* observaram um distinto perfil de produção das citocinas do perfil Th1 e Th2 havendo um predomínio das citocinas IL-10 e IL-4 nos estágios iniciais da infecção.

Brelaz et al., 2012, utilizando a citometria de fluxo, observaram que PBMC de pacientes com LTA ativa frente a estímulo com antígeno solúvel e insolúvel de *L.(V).braziliensis* apresentaram aumento de citocinas IL-10 e IL4 em estágios iniciais da doença sugerindo que indivíduos susceptíveis, logo após a exposição ao parasita, desenvolvem uma resposta imunológica do tipo 2, que permite a sobrevivência e crescimento parasitário e o desenvolvimento da lesão. Com o avanço da doença, essa resposta muda para um perfil do tipo 1, ativando macrófagos o que leva ao controle do crescimento parasitário e progressão da doença. Sendo assim, é possível que o desenvolvimento da doença dependa de uma desregulação imunológica temporária durante as fases iniciais. Dessa forma, a correlação negativa entre a expressão de IL-4 e o tempo de lesão observado no presente estudo pode ser decorrente de uma parte da população estar em fase inicial da infecção.

Considerando os dados clínicos dos pacientes foi observado correlação negativa com diferença significativa entre IDRM e IFN-γ em relação ao antígeno insolúvel. Esses dados são contrários a Nogueira (2008) que observou predomínio da resposta Th1 em IDRM de pacientes com LC. No entanto, a IDRM pode ser considerada um reflexo do grau de imunidade celular do pacientes apresentando maior intensidade em pacientes com imunidade exarcerbada, como os pacientes com Leishmaniose mucocutânea (DA CRUZ, et al., 2002; NOGUEIRA, 2008). Os pacientes com LC apresentam uma resposta imune celular específica bem modulada, mas com predominância de citocinas do perfil Th1, incluindo IFN-γ, o que reflete em tendência a cura espontânea e resposta eficiente ao tratamento. Enquanto isso, a LM caracteriza-se pelo exagero das respostas celulares anti-*Leishmania* e o pela escassez de parasitas. Nos pacientes com LM, a IDRM é fortemente positiva, com áreas de enduração cutânea significamente superiores as observadas em LC nos pacientes com LM, assim como a resposta proliferativa e a produção de IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 estimuladas por antígenos de *Leishmania* em cultura de células mononucleares do sangue periférico são significativamente maiores que as observadas na LC. Esta resposta exacerbada do perfil Th1 promove a destruição do tecido onde houver depósito de partículas antigênicas. Dessa forma, a correlação negativa entre IDRM e IFN-γ pode ser justificada pelo fato de a LC não haver uma resposta imune exacerbada e o desenvolvimento de lesões destrutivas e multilantes que

ocorrem nos pacientes com Leishmaniose mucocutânea (BRASIL, 2010; DA CRUZ et al., 2002; GONTIJO; CARVALHO,2003; REITHINGER, 2007).

No presente estudo também foi verificado correlação positiva entre a IDRM e o tempo de lesão. A IDRM detecta a presença de hipersensibilidade tardia uma vez que, imunologicamente, a LTA se caracteriza pelo aparecimento de uma resposta celular durante a doença e após a cura da infecção, seja de forma espontânea ou após tratamento. O teste se torna positivo em torno de quatro meses após o início da lesão cutânea, mas não diferencia doença atual e pregressa (na maioria das vezes permanece positivo após o tratamento) (ANDRADE et al., 2009; BRASIL,2010; GONTIJO;CARVLHO, 2003).

Em humanos, em infecção por *Leishmania,* têm sido relatados os perfis de citocinas Th1 e Th2 dependendo do antígeno utilizado, tempo de evolução da doença e técnica reportada (ALDARY et al.2000; BARATTA-MASINI,2007; CASTELLANO et al.2009; COUTINHO et al.1998; GOMES-SILVA et al.2007; LEOPOLDO et al.2006;). No presente estudo, foi verificado que os pacientes com LTA ativa frente ao antígeno solúvel de *L(V.)braziliensis* apresentam um perfil de expressão Th1, através da expressão significativa de IFN-γ e TNF-α e expressão de IL-10, embora sem diferença significativa. Esse perfil sugere a existência de um mecanismo imunorregulatório, havendo a formação de uma resposta imune eficiente para o combate do parasita e a ação de citocinas regulatórias permitindo a imunorregulação da forte resposta proinflamatória exercida pelas citocinas IFN-γ e TNF-α contra *Leishmania,* pois embora essa citocina esteja envolvida no controle da infecção, sua superprodução pode contribuir para o dano tecidual e a formação da úlcera. Considerando o antígeno insolúvel de *L(V.)braziliensis* observou-se um perfil misto através da expressão significativa de IFN-γ, TNF-α, IL-4 em pacientes com LTA ativa.

Estudos mostram que essas citocinas IL-10 e IL-4 atuam inibindo a diferenciação de linfóctitos Th1 facilitando a multiplicação parasitária e o desenvolvimento da doença em estágios iniciais da infecção. Posteriormente, ou seja, com o avanço da doença, observa-se um predomínio de linfócito Th1 e aumento das citocinas IFN-γ e TNF-α, citocinas envolvidas na ativação macrofágica e controle da infecção (BARATA-MASINI et al., 2007; BRELAZ et al., 2012; ROCHA 1999).

No presente estudo foi verificado correlação positiva com diferença significativa entre as citocinas TNF-α e IL-4 em relação ao antígeno solúvel de *L(V.).braziliensis* e correlação positiva entre as IL-10 e IL-4 frente aos antígeno solúvel e insolúvel de *L(V.).braziliensis*

Dessa forma, a partir das características da população do presente estudo, é notável observar que existe um perfil misto de resposta imune tipo 1 e 2. Esse resultado pode refletir

fenômenos distintos a nível individual, incluindo um perfil misto de citocinas, o que poderia ser justificado pelo tempo de lesão de um subgrupo da população de estudo (BRELAZ et al., 2012; BARATA-MASINI et al., 2007; REIS et al., 2009; ROCHA 1999).

Assim, observa-se que a leishmaniose cutânea humana ativa está associada a uma resposta do tipo Th1 multifacetada, regulada com componentes que irão ajudar na ativação dos macrófagos para a ativação das atividades leishmanicida, bem como citocinas, que ajudam no controle desta resposta. Outros tipos celulares e citocinas também vêm sendo apontados comum papel importante na imunorregulação de doença humana, incluindo as subpopulações Th17 e Treg, alguns dos quais têm sido investigados em modelos humanos e animais da doença (GOLLOB et al., 2008). O esclarecimento do papel que estas populações desempenham na proteção e patologia é, portanto, claramente importante para a compreensão da regulação global de mecanismos da leishmaniose cutânea em humano.

7. CONCLUSÕES

1. Em pacientes provenientes de áreas endêmicas do Estado de PE, o diagnóstico da LTA foi realizado com base nos critérios clínicos e laboratoriais. Em relação aos mediadores da RI, observou-se a expressão gênica de citocinas de ambos os perfils (Th1 e Th2), sugerindo um equilíbrio ou uma imunoregulação frente aos estímulos analisados.

2. Entre as frações antigênicas analisadas, o antígeno insolúvel foi mais imunogênico porém, um maior equilíbrio Th1/Th2 foi observado frente ao antígeno solúvel. Sendo necessário mais estudos para determinação da fração antigênica candidata a Imunoterapia e a produção de vacina.

8. PERSPECTIVAS

1. Avaliar as respostas Th1 e Th2 em pacientes durante e após o tratamento, além dos curados espontaneamente, utilizando as frações antigênicas de *Leishmania* através da PCR quantitativa em tempo real.

2. Avaliar as respostas Th17 e T_{reg} em pacientes antes, durante e após o tratamento, além dos curados espontaneamente, utilizando as frações antigênicas de *Leishmania* através da PCR quantitativa em tempo real.

3. Avaliar diferentes polimorfismos em vias de mediadores imunológicos em pacientes com LTA.

4. Avaliar a produção de proteínas referentes ao alvos imunológicos avaliados através de Western Blot.

9. REFERÊNCIAS

AJDARY, S. et al. Comparison of the immune profile of non-healing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. **Infection and Immunity** 68:1760–1764, 2000.

ALVAR et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence, **Plos one**, v 7(5) e 35671,Geneva, 2012.

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

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

ANDRADE, M.S et al. New outbrek of American tegumentar leishmaniasis in a military training center in the Zona da Mata region, in the north of the State of Pernambuco, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de janeiro, v.42, n.5, p.594-596, 2009.

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

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

BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 production among patients with american cutaneous leishmaniasis. **The Jounal of Infectious Diseases,** Bahia, v. 200, p.75-78, 2009.

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

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

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

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

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

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

BOGDAN, C. Nitric Oxide and The imune response, **Nature**, Germany, v.2 (10), p.907-916, 2001.

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

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

BOURREAU E. et al. High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment**. The Journal of Infectious Disease**, French Guiana, v.184: 1628–1630, 2001.

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

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

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Brasília, ano 10, n. 2, 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Brasília, 180p, 2010

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

BRELAZ, M. C. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, Oxford, v.34., n. 4, p. 236-239, 2012.

BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.45, n.4, p.425-429, 2012.

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

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

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

CÁCERES-DITTMAR, G., et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction**. Clinical Experimental Immunology,** v. 91, p. 500-505, 1993.

CALVOPINA, M. et al. Leishmania isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation. **BMC Infectious Diseases**, London, v.6, p.139, 2006.

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

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

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

CARVALHO, L.P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v.2, p.301, 2012.

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

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

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

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

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

CROFT, S. L. et al. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CUMMINGS, H. et al. Cytokines and Their STATs in Cutaneous and Visceral Leishmaniasi. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 6pages v. 2010

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

DE BRUIJN, M.; BARKER, D. C. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the Leishmania braziliensis complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta tropica, Basel, v. 52, p. 45-58, 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Exeter, v. 27, p. 305-318, 2004. **Diseases**, Chicago, v. 177, n. 6, p. 1687-1695,1998.

DIAZ, R.Y. et al. T-bet, Gata-3 and Foxp3 expression and Th1/Th2 cytokine production in the clinical outcome of human infection with Leishmania (Viannia) species, **The journal of infectious disease**, v (3), p.406-415, 2012.

DUSSE, L.M.S. et al.. Nitric Oxide Revision. Rio de janeiro.v.39, N.4,P.343-350, 2003.

DUTHIE, M. S. et al. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v.30, n.2, p.134-141, 2012.

ETTINGER et al. Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan Leishmania chagasi. **PLoS Neglected Tropical Disease,** USA, v.2(6): e252, 2008.

FABER, W et al.. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy Dermatology**, v.49, n. 1, p. 70-74, 2003.

GIULIETTI, A. et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.

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

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

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

GONZALEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, v.2, art. No. CD004834, 2009.

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

GREEN, S. G. et al. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. **Immunological Letters**, v. 43, p. 87-94, 1994.

HÄRTEL, C.; BEINS, G.; MULLER-STEINHARDT,M.;KLUTER,H; Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples,. **Journal of Immunological Methods**, Germany v. , p 63-71, 2001.

HORTA MF, MENDES BP, ROMA EH, NORONHA FSM, MACÊDO JP, OLIVEIRA LS et al. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, Belo Horizonte, doi: 10.1155/2012/203818 , 2012.

JULIO C MACHADO JUNIOR et al. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Journal of Pharmacognosy**, Brasil, v. 16, p: 645-655, 2006.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of global infectious diseases**, Mumbai, v. 2, p. 177-185, 2010. leishmaniasis in Iranian patients. **Cytokine**, Londres, v. 35, n. 3-4, p. 159-165, 2006.

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

LIMA, H. C. et al. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p.71-76, 1999.

LIVAK, K.J; SCHMITTGEN,T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method. **Methods,** California, v., p:402-8,2001

LOUZIR, H., et al. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **The Journal of Infectious disease,** Tunísia, v.177 (6), p.1687-1695, 1998.

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

MONZOTE, L. Current treatment of Leishmaniasis: A Review. **The open Antimicrobial Agents Journa**l, Havana City,Cuba,,v , p.9-10, 2009.

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

NOGUEIRA, M.F. et al. American tegumentary leishmaniasis: langerhans cells in montenegro skin test. **Revista Instituto de Medicina. Tropical, São Paulo**, v., p.283-286 ,2008.

NOGUEIRA, M.F; GOTO, H.; SOTTO, M.N.; CUCE, L.C.Cytokine profile in montenegro skin test of patients with localized cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Revista Instituto de Medicina tropical**, São Paulo, v., p.333-337,2008.

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

OLIVEIRA, A.P. et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live Leishmania (Viannia) braziliensis immunoglobulin G. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v.387, n.1-2, p.245-253, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Cutaneous Leishmaniasis- Why are you neglecting me?** Geneva, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis.** Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em dezembro de 2012.

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

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29(9):e45, 2001.

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

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

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

POURMOHAMMADI B. et al., Comparasion of three methods for diagnosis of cutneous leishmaniasis, **Iranian Journal of Parasitolology,** Iran,v.5(4), p.1-8, 2010.

RADKE L. et al. Induced cytokine response of human PMBC-cultures: correlation of gene expression and secretion profiling and the effect of cryopreservation. **Cellular Immunology, Germany,** v. 272 (2), p.144-53, 2012.

REIS, L. C. et al. Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. **Journal of Clinical Laboratory Analysis, v.** 23(1), p.63-69, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

RODRIGUES, E.H.G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in a area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40 (10), p. 3572-3576, 2002.

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

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHARMA, U; SINGH,S. Immunobiology of leishmaniasis. I**ndian Journal of Experimental Biology**, v.47, p.412-423, 2009.

SOUZA, A. S. et. al. Resistance of Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-alpha production**. BMC Infectious Diseases.** 2010, v.10, p 209, 2010.

SOUZA, et al., Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profilesin active disease, after therapy and in self-healed individuals, **Microbial pathogenesis**, Brasil, v.57, p: 27-32, 2013.

SOUZA, M.A et al. American Tegumentary Leishmaniasis:Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Cure, with or without chemotherapy. **Scandinavian journal of Immunology,** v. 76 (2), p. 175-180, 2012.

SUNI, M. A. et al. *Ex vivo* analysis of T-cell function. **Current Opinion in Immunology**, Londres, v. 17, p. 434-440, 2005.

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

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

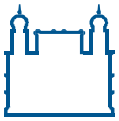
VIEIRA, M. G., et al. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituo Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 979-83, 2002.

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

Apêndice A

Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente

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

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

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

Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema imunológico poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema imunológico participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco.

Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecido por um participante do projeto. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

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

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

_____ _____
Assinatura do paciente ou menor data

_____ _____
Assinatura do responsável data

_____ _____
Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ data

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

Apêndice B

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

FIOCRUZ

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

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

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

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

Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema imunológico poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema imunológico participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco.

Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecido por um participante do projeto. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

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

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

_____ _____

Assinatura do paciente ou menor data

_____ _____

Assinatura do responsável data

_____ _____

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ data

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

Apêndice C

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

FIOCRUZ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle

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

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

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

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

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

_____ _____

Assinatura do voluntário data

_____ _____

Assinatura do responsável data

_____ _____

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ data

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

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

Apêndice D

Ficha do Paciente

Código Interno

Nome:		
Localidade:		
Anos de exposição:	Data de Nascimento:	Sexo:
Profissão:		

Coleta de Sangue AT:	Coleta de Sangue PT: ___/___/___
Evolução da doença AT:	Evolução da doença PT:
Forma Clínica AT:	Forma Clínica PT:
No. de Lesões/Local/Tamanho (cm):	No. de Lesões/Local/Tamanho (cm):
Número de Ampolas Utilizadas no Tratamento:	
Coleta Resistência: ___/___/___ OBS:	Coleta Recidiva/Nova Infecção: ___/___/___ OBS:

Ensaios Realizados

Cultura p/ sobrenadante (tempo): Ensaios realizados com sobrenadante:					Armazenado (local):	
Células para RT qPCR (tempo): Síntese do cDNA: ___/___/___ Ensaios realizados com o cDNA:					Armazenado (local): Armazenado (local):	
Cultura p/ Citometria de fluxo:			Pop. estudadas:			
Citometria de fluxo *ex vivo*(marcadores):						
Armazenamento Sangue EDTA (qtd/ml): Extração de DNA: ___/___/___				Armazenado (local): Ensaio realizado:		
Soro (local/qtd):			Plasma (local/qtd):			
Diagnóstico com Citometria: AT	1a PT	2a PT	3a PT	4a PT	5a PT	10a PT
Biópsia (local):			Ensaio realizado:			

Testes Diagnósticos:

IDRM:	IFI:	PCR:	Pesquisa Direta:
Punção Aspirativa:		Isolamento:	

Anexo A

Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

FIOCRUZ
Ministério da Saúde

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CPqAM/FIOCRUZ

Título do Projeto: "Caracterização da resposta imune celular em portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após cura clínica."
Pesquisador responsável: Valéria Rego Alves Pereira
Instituição onde se realizará o projeto: CPqAM/FIOCRUZ
Data de apresentação ao CEP: 21/11/2005
Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 60/05
Registro no CAEE: 0757.0.095.000-05

PARECER

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

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

Recife, 08 de março de 2006

Ana Maria A. Santos

Drª Ana Maria Aguiar dos Santos
Médica
Coordenação
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:

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

Anexo B

CEP
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO

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

Recife, 08 de setembro de 2009.

Gisélia Campozana Gomes
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0468770
CPqAM / FIOCRUZ

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

AGGEU MAGALHÃES
FIOCRUZ