

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

MARIA CAROLINA ACCIOLY BRELAZ DE CASTRO

**Estudo do papel de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e suas citocinas na
Leishmaniose Tegumentar Americana**

Recife

2013

MARIA CAROLINA ACCIOLY BRELAZ DE CASTRO

**Estudo do papel de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e suas
citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana**

**Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do
Título de Doutora em Inovação
Terapêutica**

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

**Recife
2013**

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.

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Castro, Maria Carolina Accioly Brelaz de

Estudo do papel de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana/ Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro– Recife: O Autor, 2013.

132 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Valéria Rêgo Alves Pereira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2013.

Inclui bibliografia, apêndices e anexos

- 1. Linfócitos 2. Leishmaniose 3. PCR (Bioquímica) I. Pereira, Valéria Rêgo Alves (orientadora) II. Título**

571.96

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 055

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CASTRO, Maria Carolina Accioly Brelaz de

Título: Estudo do papel de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 05/02/2013

Banca Examinadora

Profa. Dra. Milena de Paiva Cavalcanti

Instituição: CPqAM-FIOCRUZ

Assinatura: _____

Profa. Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro

Instituição: CPqAM-FIOCRUZ

Assinatura: _____

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Assinatura: _____

Profa. Dra. Patrícia Freire Muniz M. F. de Moura

Instituição: Universidade de Pernambuco- UPE

Assinatura: _____

Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

Instituição: CPqAM-FIOCRUZ

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes portadores de leishmaniose por aceitarem fazer parte deste trabalho, por compartilharem suas histórias e muitas vezes abrirem seus lares para nos receber.

Aos meus pais, Jalmir e Márcia, por todo amor, apoio e incentivo ao longo dos anos. Vocês são grandes exemplos de amor, dedicação, profissionalismo e competência na minha vida.

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

A meu namorado, Luis Eduardo Corrêa de Oliveira, pelos conselhos, carinho, amor e cumplicidade ao longo dos anos. Nossa história torna meus dias especiais. Obrigada também pelas dicas de informática e de formatação.

A minha orientadora Valéria, pela oportunidade e pelo apoio em todos os momentos da minha formação, sempre estando disponível para discussões científicas ou não. Agradeço sua orientação, amizade, confiança e estímulos ao longo dos anos.

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

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

A toda a equipe do Laboratório de Imunogenética pelos bons momentos e apoio no dia a dia. Os resultados desse trabalho são derivados de um esforço em equipe, em que todos contribuíram de uma maneira ou de outra. Agradeço, sobretudo, a Amanda Almeida, pelo apoio, companheirismo e paciência nas citometrias (e muitas manhãs/tardes/noites de música!), e a Thays Almeida pelos ensinamentos, eterna disposição e apoio nas qPCRs. Agradeço também a Renan Garcia pela ajuda nas PCRs. Agradeço ainda Andresa Oliveira, Marina Souza, Lucas Rocha, Thiago André, Aline Caroline e a Beatriz Oliveira pela convivência diária, amizade e apoio nos experimentos.

A Dra. Norma Lucena pelo apoio e ensinamentos nos estudos genéticos.

A Maria Edileuza Brito, e ao Núcleo de Vigilância em Saúde e Ambiente do Município de Moreno, principalmente a Cláudio e Lucinha, pelo apoio com os pacientes e com o diagnóstico. Agradeço também ao Núcleo de Saúde de Vitória de Santo Antão pelo apoio na busca dos pacientes, sobretudo a médica Rosana Barreto e a técnica Suzana. Agradeço ainda aos agentes comunitários de saúde de Serra Grande, por se disponibilizarem e facilitarem às visitas às residências dos pacientes conosco.

Aos amigos do Departamento de Imunologia e do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães pelos ensinamentos, dicas e convívio diário, que tornaram meus dias mais agradáveis: Fabiana, Kaly, Danielle, Romero, Neide, Lilian, Eduardo, Suellen, Karinne e demais. Um agradecimento especial a Roberto Werkhäuser e a Mineo Nakazawa pelos esclarecimentos nos momentos de dúvida e suporte nos momentos necessários. Agradeço também ao motorista Fernando, por sua disponibilidade e ajuda.

A minha querida amiga Juliana Santos, minha irmã do coração e companheira de aventuras. Obrigada pelo amor, otimismo e confiança, e por ser um verdadeiro porto seguro para mim ao longo dos anos.

Também aos queridos amigos “Napianos” Paulyne Figueiredo, Pedro Santos, Maria Wanick, Natália Oikawa e Rafael Rodrigues pela eterna animação, amizade, saídas para descontrair, conversas e incentivos sempre. Agradeço também as nossas excelentes discussões “filosóficas” (ou não) sobre a vida.

As amigas da escola Camila Colares (*in memoriam*), Talita Souto, Ana Amélia Almeida, Natália Alfaro, Marina Moneta e Élide Ribeiro cuja amizade de longa data sempre me auxiliou.

Aos amigos de curso de Biomedicina da UFPE: Luís Claudio, Rafael Freitas, Anacássia Fonseca, Julliana Ribeiro, Veridiana Souza, Iana Rafaela, Giovanna Gayoso, Renato Silva, Jana Sandes, Amanda Aliança, Lívia Bandeira, Thiago de

Lavor, Marcia, Adrienne e demais, pela torcida, apoio e companheirismo nesses anos.

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 tese. Em especial ao secretário Paulo Germano e a professora Suely Galdino (*in memoriam*) pelo auxílio.

A CAPES e ao CNPq por financiar o estudo.

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

“Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça. Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”.

-Cora Coralina

“The Road goes ever on and on
Down from the door where it began.
Now far ahead the Road has gone,
And I must follow, if I can,
Pursuing it with eager feet,
Until it joins some larger way
Where many paths and errands meet.
And whither then? I cannot say” .

— J.R.R. Tolkien

RESUMO

Castro, M. C. A. B. **Estudo do papel de linfócitos T CD4⁺ e CD8 e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença negligenciada com distribuição mundial, acometendo principalmente àquele com menor status socioeconômico. No Brasil, a LTA já foi visualizada em todos os Estados, sendo endêmica em Pernambuco. A LTA pode apresentar variadas formas clínicas, e a forma cutânea é a manifestação mais comum. A resposta imunológica desempenha um importante papel na cura clínica da doença ou na sua progressão, e os linfócitos T são fundamentais. Células T CD4⁺ e CD8⁺ são fontes produtoras de citocinas, atuando nos mecanismos de cura e patogênese da doença. A resposta linfocitária é caracterizada principalmente pelo aumento de células T CD4⁺. Os subtipos Th1 e Th2, seu direcionamento e papel, são ao mais bem descritos na susceptibilidade e resistência a LTA. Recentemente células T regulatórias e células Th17 também vêm se destacando. Dessa maneira, os objetivos desse estudo foram avaliar a participação de linfócitos T (CD4⁺, CD8⁺, Th1, Th2, Th17 e Treg) e de suas citocinas (IFN- γ , TNF, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23) em indivíduos com LTA ativa e naqueles após a cura clínica (espontânea ou após tratamento). A imunofenotipagem e avaliação de citocinas foram feitas por citometria de fluxo, CBA, e através da quantificação relativa do mRNA das citocinas por qPCR. Os resultados desse trabalho, apresentados em três artigos, mostraram que o balanço na proporção de células T CD4⁺ e CD8⁺ é importante para cicatrização das lesões na LTA, e que o tratamento com antimonial não induz nenhuma mudança deletéria na proporção de linfócitos T na corrente sanguínea. Além disso, foi visto que as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* são capazes de induzir uma resposta imune específica por parte dos pacientes com LTA. Transcritos para TNF e IFN- γ foram encontrados significativamente aumentadas após 24h de cultura quando comparado aos controles; no entanto, não foi possível identificar sua população secretora. O desenvolvimento da doença parece estar relacionado a uma desregulação imunológica temporária no início da infecção, caracterizada por um predomínio do perfil Th2 nos pacientes com lesão ativa, e a cura ao desenvolvimento de uma resposta do tipo 1. Essa resposta aparenta ser balanceada/coordenada por mecanismos que envolvem a citocina IL-10, e células Treg e suas subpopulações expressando marcadores de imunossupressão e migração tecidual foram observadas nos indivíduos com LTA ativa. Foi visto ainda a presença significativa de citocinas Th17, sugerindo a sua associação com a patogênese da doença. O estudo mostrou que a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro na LTA é dinâmica, e contribui em futuros estudos para desenho apropriado de intervenções imunológicas em pacientes e de vacinas.

Palavras chave: Leishmaniose tegumentar americana, Linfócitos T, citometria de fluxo, PCR em tempo real

ABSTRACT

Castro, M. C. A. B. **Study of the role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and their cytokines in Cutaneous Leishmaniasis.** Thesis (Doctorate). Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, 2013.

Cutaneous leishmaniasis (ACL) is a neglected disease with worldwide distribution, affecting mainly the ones with lower socioeconomic status. In Brazil, ACL was verified in all states, being endemic in Pernambuco. The ACL can have different clinical presentations, and the cutaneous one is the most common manifestation. The immune response plays an important role in the disease clinical cure or progression, and T lymphocytes are critical. CD4⁺ and CD8⁺ T cells are cytokine sources, acting on the mechanisms of disease pathogenesis and cure. The lymphocyte response is characterized mainly by an increase in CD4⁺ T cells. Th1 and Th2 subtypes, their direction and role, are the ones better described in the susceptibility and resistance in ACL. Recently, regulatory T cells and Th17 cells have also been highlighted. Thus, the objectives of this study were to evaluate the participation of T lymphocytes (CD4⁺, CD8⁺, Th1, Th2, Th17 and Treg) and their cytokines (IFN- γ , TNF, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22 and IL-23) in subjects with active ACL and in those after clinical cure (spontaneously or after treatment). Immunophenotyping and cytokines evaluation were done by flow cytometry, CBA, and through the relative quantification of mRNA of cytokines by qPCR. The results of this work, presented in three articles, showed that the balance in the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ T cells is important for lesion healing in ACL, and that antimony treatment does not induce any deleterious change in the proportion of T lymphocytes into the bloodstream. Furthermore, it was seen that the soluble and insoluble antigenic fractions of *L. (V.) braziliensis* are capable of inducing a specific immune response from patients with ACL. Transcripts for TNF and IFN- γ were found significantly enhanced after 24h of culture when compared to controls; however, it was not possible to identify their secretory population. The development of the disease seems to be related to a temporary immune dysregulation early in infection, characterized by Th2 profile predominance in patients with active disease, and its cure to the development of a type 1 response. This response appears to be balanced/coordinated by mechanisms involving the cytokine IL-10, and Treg cells and their subpopulations were seen in subjects with active LTA, expressing markers of immunosuppression and tissue migration. Th17 cytokines was also observed in those patients, suggesting its association with disease pathogenesis. The study showed that the immune response developed by the host in ACL is dynamic, and contributes to future studies to design appropriate immunological interventions in patients and vaccines.

Key Words: Cutaneous Leishmaniasis, T Lymphocytes Flow cytometry, real time PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição mundial da leishmaniose cutânea	21
Figura 2- Formas da <i>Leishmania</i> : promastigota (A) e amastigota dentro de macrófago (B).....	24
Figura 3- Ciclo biológico da <i>Leishmania spp.</i>	25
Figura 4- Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	27
Figura 5- Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana	29
Figura 6 - Principais componentes da resposta imune inata contra a <i>Leishmania spp.</i>	35
Figura 7- Subtipos de células T	40
Figura 8- Subtipos de células Treg.....	40
Figura 9- Exemplo de gráfico de FSCxSSC em PBMC com delimitação na região linfocitária.	48
Figura 10- Gráfico FSC x SSC em sangue periférico com delimitação na região linfocitária	48
Figura 11- Gráfico de fluorescência (FL1xFL2) e respectivos histogramas utilizado para avaliar o percentual de linfócitos T produtores de citocinas na citometria de fluxo.....	49
Figura 12- Estratégia para análise de linfócitos Treg e seus marcadores na citometria de fluxo.....	49
Figura 13- Estratégia para análise de linfócitos Th17 produtoras de citocinas na citometria de fluxo.	50
Figura 14- SDS-PAGE of soluble proteins (1 and 2) and insoluble (3 and 4) of <i>L. (V.) braziliensis</i> (Artigo 1).....	61

Figura 15- CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells percentage comparison in cultures and <i>ex-vivo</i> assays. (Artigo 1)	64
Figura 16- Cytokine expression by (A) CD4 ⁺ and (B) CD8 ⁺ T cells after in vitro stimulation with: <i>Leishmania</i> soluble antigenic fraction (1.25µg/ml) and <i>Leishmania</i> insoluble (2.25µg/ml) antigenic fraction(Artigo 1)	67
Figura 17- Representative FACS dot plots of cytokine expression by (A) CD4 ⁺ and (B) CD8 ⁺ T cells. (Artigo 1)	67
Figura 18- Patients and controls cytokines mRNA expression 24h after PBMC culture with the mitogen PHA or with the soluble (SOL) and insoluble (INS) antigenic fractions of <i>L. (V.) braziliensis</i> , following normalization with the reference gene (18S). (Artigo 2).....	82
Figura 19- Cytokine expression by A) T cells, B) CD4 ⁺ T cells and C) CD8 ⁺ T after in vitro stimulation with PHA, <i>Leishmania</i> soluble (SOL) and insoluble (INS) antigenic fractions (Artigo 2)	84
Figura 20- Percentual de expressão de citocinas tipo 1 e 2 por linfócitos T após estimulação in vitro com PMA (50ng/ml)/ionomicina(50ng/ml) (Artigo 3).	103
Figura 21- Percentual de expressão de citocinas Th17 por linfócitos CD4 ⁺ T após estimulação in vitro com PMA (50ng/ml)/ionomicina (50ng/ml) (Artigo 3).	104
Figure 22- Subpopulações de células Treg (A) e de marcadores (B) em análise <i>ex vivo</i> de pacientes antes do tratamento (Artigo 3).	106
Figura 23- Correlação entre os perfis Th1/Th2/Th17 e Treg: A)Th1xTh17; B)Th2xTh17; C) Th1xTreg; D) Th1xTh2; E) Th17xTreg; F) Th2xTreg (Artigo 3).....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Formas clínicas da Leishmaniose, principais espécies responsáveis e localização geográfica.	23
Tabela 2- Lista de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de citometria de fluxo	50
Tabela 3- Test results of the study group and patient status (Artigo 1)	59
Tabela 4- CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T cell ratio <i>ex vivo</i> and in cultures stimulated with leishmania soluble and insoluble antigenic fractions (Artigo 1)	65
Tabela 5- Test results and characteristics of the study group (Artigo 2)	77
Table 6- CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T cell ratio and IFN- γ ⁺ /IL-10 ⁺ ratio in cultures stimulated 48h with Leishmania soluble and insoluble antigenic fractions. (Artigo 2).....	83
Tabela 7: percentual de linfócitos T e razão CD4/CD8 em culturas estimuladas por 6h com PMA/ionomicina (Artigo 3).....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgSol	Fração antigênica solúvel de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>
Ag Ins	Fração antigênica solúvel de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>
AF647	Fluorocromo Alexa Fluor® 647
APC	Fluorocromo Aloficocianina
CD	Cluster de diferenciação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
FITC	Fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína
FL	Canal de Leitura de Fluorescência
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Reação de imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
mRNA	RNA mensageiro
NK	Células exterminadoras naturais
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase

qPCR	PCR em tempo real quantitativa
PE	Fluorocromo ficoeritrina
PE Cy-7	Fluorocromo ficoeritrina conjugado com cianina
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Acetato de meristato forbol
PMSF	Metil-fenil-fluoreto
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SBF	Soro bovino fetal
SbV	Antimoniais pentavalentes
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
CD	<i>Cluster differentiation</i> (Grupamento de diferenciação)
TA	Temperatura Ambiente
TGF- β	Fator beta de crescimento e transformação
Th	Linfócito T auxiliar
TNF	Fator de necrose tumoral alpha
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Geral.....	18
2.2	Específicos	18
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	Aspectos Gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana	20
3.2	Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	25
3.3	Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	28
3.4	Tratamento e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana	29
3.5	Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana.....	33
4	METODOLOGIA	42
4.1	Caracterização do estudo	42
4.1.1	Processo de seleção da população estudada	42
4.1.2	Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes	43
4.2	Considerações éticas	44
4.3	Obtenção das frações antigênicas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	44
4.4	Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	45
4.5	Ensaio de citometria de fluxo	45
4.5.1	Ensaio de imunofenotipagem em sangue periférico (T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺)	45
4.5.2	Ensaio de imunofenotipagem em PBMC (Th1, Th2 e Th17)	46
4.5.3	Marcação <i>ex vivo</i> de linfócitos Treg	47
4.5.4	Estratégia de análise na citometria de fluxo	48
4.5.5	Anticorpos monoclonais utilizados nas marcações por citometria de fluxo	50
4.5.6	Avaliação da concentração de citocinas no soro de pacientes com LTA	52
4.6	Cultura celular, isolamento de RNA e síntese do cDNA.....	52

4.7	PCR real quantitativa por transcrição reversa (RTqPCR)	53
4.8	Análise estatística.....	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Artigo 1 (publicado na revista Cellular Immunology, V.279(2): p 180-186)	55
5.2	Artigo 2 (submetido a Human Immunology em 01/2013).....	74
5.3	Artigo 3 (Manuscrito em fase de redação).....	96
6	CONCLUSÕES	112
7	PERSPECTIVAS.....	114
	REFERÊNCIAS.....	115
	APÊNDICE A	125
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente	125
	APÊNDICE B	126
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente menor de 18 anos	126
	APÊNDICE C	127
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle	127
	APÊNDICE D- TRABALHOS E ESTUDOS REALIZADOS NO DOUTORADO	128
	ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	130
	ANEXO B - PRORROGAÇÃO DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	131
	ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA- PROJETO TREG	132

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é um problema de saúde pública, afetando a produtividade e a saúde das pessoas. Essa é uma doença com distribuição mundial, principalmente acometendo aqueles com menor status socioeconômico de países menos desenvolvidos. Suas perspectivas de controle são ainda muito dependentes do progresso nas pesquisas científicas para se obter estratégias mais efetivas para o controle de casos e do vetor (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010, DESJEUX, 2004).

Essa é uma doença que apresenta um ciclo heteroxênico, sendo transmitida por flebotomíneos infectados aos hospedeiros mamíferos (CROFT *et al.*, 2006, TIUMAN *et al.*, 2011). Dentro do hospedeiro vertebrado, as *leishmanias* são internalizadas por células do sistema monocítico fagocitário que estão envolvidos na evolução ou cura da doença (REITHINGER *et al.*, 2007; TIUMAN *et al.*, 2011).

Na LTA os aspectos clínicos da doença variam desde manifestações cutâneas com pequenos nódulos até a destruição das mucosas, sendo as formas cutâneas as mais comuns (GOTO; LINDOSO, 2010; TIUMAN *et al.*, 2011). O tratamento da LTA é feito com antimoniais pentavalentes ou drogas consideradas de segunda escolha, como a anfotericina B, e visa acelerar a cura, diminuir as cicatrizes e o risco de disseminação da doença.

Os estudos imunológicos são indispensáveis para descrever os mecanismos de defesa que ocorrem durante as infecções, devendo também ser considerado os componentes genéticos que influenciam o desenvolvimento da patologia. Na leishmaniose humana, o padrão de resposta imune do tipo Th1 com produção de citocinas como IFN- γ e TNF tem sido associado com a ativação macrofágica e destruição parasitária, enquanto os mecanismos de morbidade estão associados com citocinas do perfil Th2 como IL-4, IL-10 e TGF- β (AMEEN, 2010; REITHINGER *et al.*, 2007; ROBERTS, 2006). No entanto, a dicotomia Th1xTh2 é uma simplificação da resposta imunológica, que é mais complexa e envolve outros subtipos de células T, como células T regulatórias (Treg) e células Th17. Ao que parece, o balanço entre as células Treg e Th17 pode ser essencial para a manutenção do equilíbrio imunológico. As células Treg estão envolvidas na tolerância imunológica, enquanto a resposta Th17 provavelmente surge como

uma resposta inicial a um grande número de patógenos que não são bem resolvidos pela resposta do tipo Th1 e que requerem inflamação tecidual mais exacerbada (NYLÉN; GAUTAM, 2010; BETTELLI *et al.* 2008). Entretanto, a função dos subtipos Th1, Th2, Treg e Th17 na resolução ou perpetuação na leishmaniose tegumentar humana não está completamente elucidada.

No presente trabalho apresentamos uma revisão da literatura sobre a LTA, seguido dos objetivos e metodologia utilizados. Os resultados e discussões estão apresentados em 3 artigos. O primeiro artigo, publicado no periódico *Cellular Immunology* (279: 180-186, 2012), mostrou a avaliação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no contexto *ex vivo*, além do seu balanço e perfil de citocinas, após estimulação com as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* em pacientes com a doença ativa e após cura clínica (espontânea ou após tratamento). O segundo artigo, submetido a *Human Immunology* em janeiro de 2013, apresenta as diferenças da resposta imune em pacientes com a lesão ativa e controles através da citometria de fluxo e qPCR, após estimulação com as frações antigênicas e com o mitógeno PHA. Por fim, no terceiro artigo, as respostas Th1, Th2, Treg e Th17 em pacientes antes do tratamento e controles são investigadas. Diante dos resultados obtidos neste projeto, pretende-se contribuir para o entendimento dos mecanismos imunológicos em pacientes com LTA, além de fornecer subsídios para a pesquisa de vacinas e imunoterapias.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar os mecanismos imunológicos ao avaliar a participação de linfócitos T e de suas citocinas no desenvolvimento de lesões cutâneas e na resposta ao tratamento em indivíduos com leishmaniose tegumentar americana ativa e após a cura clínica.

2.2 Específicos

- a) Verificar no sangue periférico dos pacientes com LTA ativa e após cura clínica (espontânea ou após tratamento) a proporção dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no contexto *ex vivo* e em culturas de células mononucleadas estimuladas *in vitro* com as frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis*;
- b) Identificar nas células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) dos pacientes com LTA ativa e após cura clínica (espontânea ou após tratamento) a produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-4 e IL-10 pelos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, frente ao estímulo *in vitro* com as frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis*;
- c) Quantificar nas PBMC dos pacientes com LTA ativa a expressão do RNA mensageiro das citocinas IFN- γ , TNF, IL-4 e IL-10, frente ao estímulo *in vitro* com as frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis* e com o mitógeno PHA;
- d) Apontar nas células mononucleadas do sangue periférico dos pacientes com LTA ativa os linfócitos Th17 e as citocinas IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23 frente ao estímulo *in vitro* com o mitógeno PMA e ionomicina;
- e) Distinguir em células mononucleadas do sangue periférico de pacientes com LTA ativa, os linfócitos Treg, suas subpopulações (aTreg, nTreg e rTreg) e seus marcadores CD25, CD45RA, CLA, CCR4, CCR7, FOXP3, CTLA-4 e citocina IL-10 no contexto *ex vivo*;

- f) Mensurar em pacientes com LTA ativa e controles a concentração sérica das citocinas IFN- γ , TNF, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana

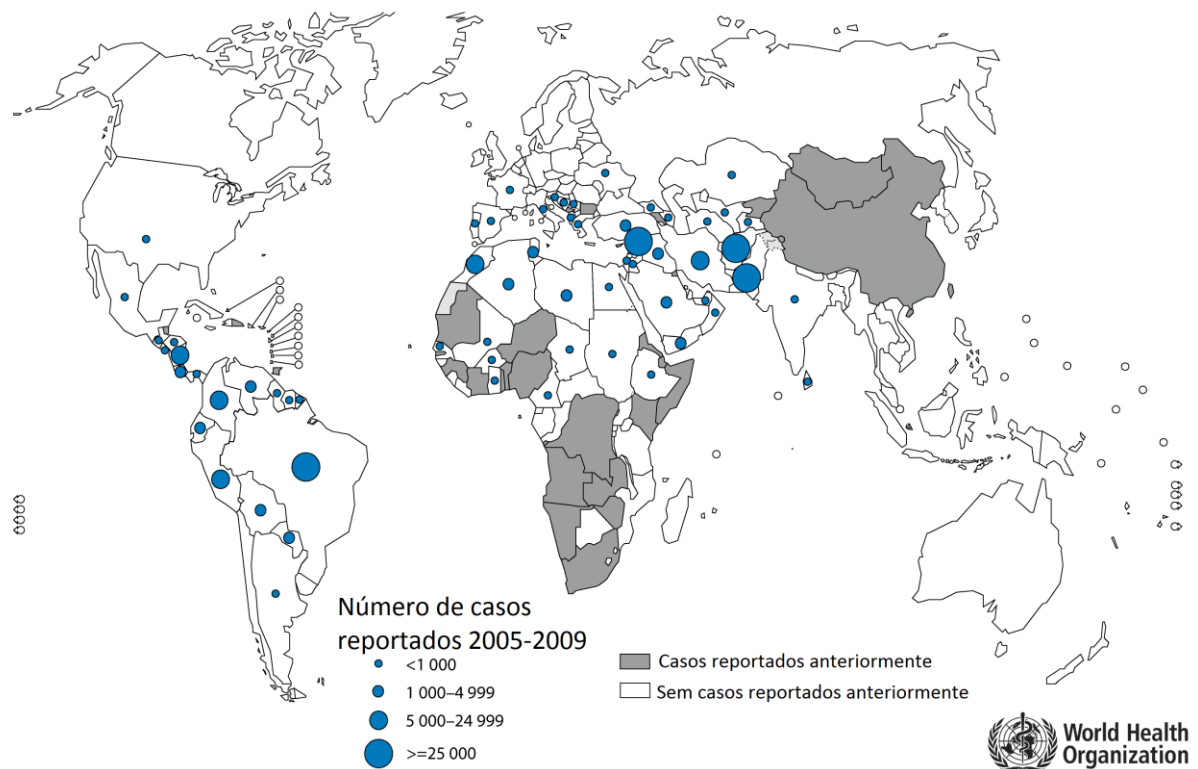
A leishmaniose é considerada um problema de saúde pública, com um aumento de incidência observada nos últimos anos (GOTO; LINDOSO, 2010; REITHINGER *et al.*, 2007). Esse aumento pode ser atribuído não apenas a melhorias no diagnóstico e notificação, mas também a mudanças ecológicas e no habitat do vetor, causada por desflorestamento, urbanização, migração, conflitos armados, assim como medidas inadequadas ou insuficientes de controle dos vetores e reservatórios (AMEEN, 2010; OMS, 2012; REITHINGER *et al.*, 2007). Nos últimos anos vem sendo reportado caso de resistência às drogas leishmanicidas (CROFT, SUNDAR, 2006; DUTHIE, 2012).

A leishmaniose apresenta distribuição mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Ela foi relatada em 98 países na Europa, África, Ásia e Américas, com 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010). Estima-se que a Leishmaniose tegumentar americana (LTA) tenha uma prevalência de 10 milhões de casos, com 1-1,5 milhões de ocorrências anuais (Figura 1). No entanto, a subnotificação ainda é um fato presente, com apenas um terço dos países considerados endêmicos realizando notificação obrigatória, entre eles o Brasil (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010). Além disso, como muitas infecções não apresentam sintomas ou são mal diagnosticadas, o número global da leishmaniose tegumentar é provavelmente subestimado (GONZALEZ *et al.*, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010; REITHINGER *et al.*, 2007).

A LTA é uma doença negligenciada e que acomete principalmente àquele com menor status socioeconômicos e com limitada capacidade de assumir os custos da doença (diagnóstico, hospitalização, tratamento) e suas consequências, que envolvem desde lesões simples até deformidades (CLEM, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010, 2007). Muitas das pessoas afetadas moram em regiões pobres e estão permanentemente expostas a fatores de risco, frequentemente devido a causas ocupacionais (BRITO *et al.* 2012; ORGANIZAÇÃO

MUNDIAL DA SAÚDE, 2010, 2007). Dessa maneira, é uma doença que merece maior atenção devido à sua magnitude, alta morbidade e possibilidade de causa deformidades estigmatizantes (ANDRADE *et al.*, 2005; CLEM, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Figura 1- Distribuição mundial da leishmaniose cutânea



Fonte: Organização mundial da saúde (2009)

No continente americano a LTA distribui-se amplamente, tendo sido relatados casos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, excluindo o Chile e o Uruguai (GONTIJO; CARVALHO, 2003). No Brasil, a LTA tem sido assinalada em todos os Estados e acredita-se que picos de transmissão ocorram a cada cinco anos (ALVAR *et al.*, 2012). A LTA tem predominância em indivíduos do sexo masculino e naqueles acima 10 anos (ALVAR *et al.*, 2012). Dados do Ministério da Saúde revelam que entre os anos de 2000 a 2008 foram registrados 238.749 novos casos, com uma média anual de 26.528 casos novos (BRASIL, 2010). A região Norte e Nordeste são as que mais apresentam novos casos no país (BRASIL, 2010). Em Pernambuco, observa-se uma incidência em todas as regiões do Estado, predominantemente na Zona da Mata, onde a doença é considerada endêmica e

onde eventualmente se observam surtos (BRITO *et al.*, 2009, 2012). Entre os anos de 2001 a 2010, 4.855 casos de LTA foram reportados em Pernambuco, com uma média de 485 casos/ano (BRITO *et al.*, 2012).

As leishmanias pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, e subgênero *Leishmania* ou *Viannia*, com mais de 20 espécies desses protozoários sendo responsáveis pela doença em humanos (AMEEN, 2010; BRITO *et al.*, 2012, CARVALHO, 2012; GOTO; LINDOSO, 2010;). Essas espécies apresentam distribuição global (Tabela 1). A *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (*L. (V.) braziliensis*) é o agente etiológico de maior prevalência no país, apresentando distribuição geográfica em todas as regiões e sendo a principal espécie identificada até o momento em Pernambuco (ANDRADE *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2009). A transmissão da doença e as infecções são normalmente realizadas através da picada de flebotomíneos, sendo outros meios de infecções raros (ex. acidentes de laboratório, compartilhamento de seringas). Nas Américas, o gênero *Lutzomyia* é o responsável pela transmissão das leishmanioses, com cerca de 350 espécies catalogadas, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina. (GONTIJO; CARVALHO, 2003; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010; REITHINGER *et al.*, 2007). A espécie *L. whitmani* é predominante na maioria dos focos de transmissão domésticos e peridomiciliares, e a *L. complexa* ou outras espécies predominam em ambientes selvagens (BRITO *et al.*, 2012).

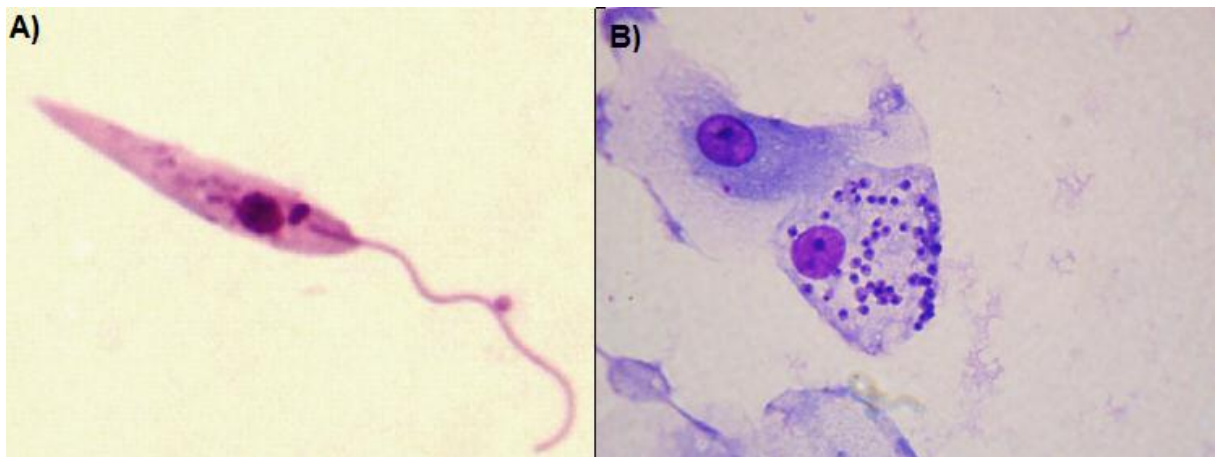
Tabela 1- Formas clínicas da Leishmaniose, principais espécies responsáveis e localização geográfica.

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

Fonte: Adaptado de Piscopo; Mallia (2006)

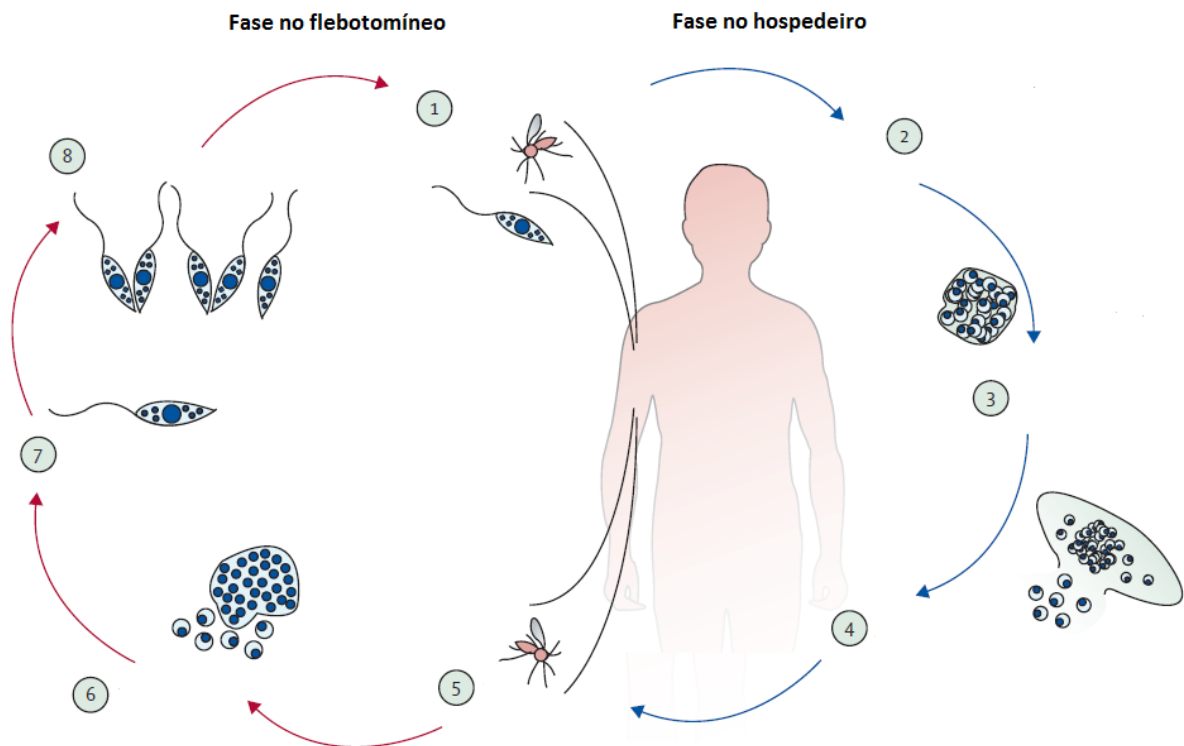
Nota: *Espécies encontradas parasitando o homem no Brasil

As *Leishmanias* apresentam-se sob a forma amastigota em seus hospedeiros vertebrados e promastigota em hospedeiro invertebrado e culturas axênicas (Figura 2). As formas amastigotas são estruturas arredondadas ou ovaladas sem flagelo, que se alojam nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos. As formas promastigotas são alongadas, com um flagelo livre e longo emergindo do corpo do parasito. São encontradas no tubo digestivo dos flebotomíneos. Ambas as formas apresentam cinetoplasto, que consiste em DNA mitocondrial, muito utilizado para testes diagnóstico (BASANO; CAMARGO, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010; ROBERTS, 2006, VEGA-LOPEZ, 2003).

Figura 2- Formas da *Leishmania*: promastigota (A) e amastigota dentro de macrófago (B)

Fonte: A- <http://www.amazonia.fiocruz.br>; B- Erfea *et al.* (2012).

A transmissão para o homem e outros vertebrados tipicamente ocorre quando o flebotômíneo infectado, ao se alimentar de sangue do hospedeiro, inocula na derme deste as formas promastigotas metacíclicas. Na derme essas formas são internalizadas por células fagocitárias onde se transformam em amastigotas. As amastigotas então se replicam até que eventualmente levam ao rompimento das células hospedeiras, sendo novamente fagocitadas. O ciclo continua quando o inseto fêmea ingere o sangue e com ele macrófagos parasitados. No vetor, esses macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas que se transformam em promastigotas e depois em promastigotas metacíclicas no intestino do flebotômíneo (num processo com duração de 8 a 20 dias). Estas serão inoculadas em um hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo (DESJEUX, 2004; REITHINGER *et al.*, 2007) (Figura 3).

Figura 3- Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Legenda:

- 1 Ao realizar repasto sanguíneo o flebotômio fêmea infectado inocula promastigotas na pele;
- 2 Promastigotas são internalizados por células fagocitárias;
- 3 Promastigotas se transformam em amastigotas;
- 4 Os amastigotas se replicam nas células fagocitárias e eventualmente levam ao rompimento da mesma, podendo infectar outras células fagocíticas;
- 5 O flebotômio fêmea se alimenta de sangue do hospedeiro infectado;
- 6 Ingestão de células parasitadas;
- 7 As células infectadas (geralmente macrófagos) passam para o intestino do flebotômio e se transformam em formas promastigotas;
- 8 Os promastigotas se dividem e se transformam na forma metacíclica infectante, migrando para a probóscita do flebotômio;

Fonte: Adaptado de Reithinger *et al.* (2007)

3.2 Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA apresenta manifestações clínicas diversas, associadas com padrões epidemiológicos, que variam de acordo com a espécie do flebotômio envolvida na transmissão, incluindo fatores como a dose e a rota de inoculação das *leishmanias*, com a susceptibilidade da população e o seu nível de exposição. Fatores

relacionados aos indivíduos também influenciam na apresentação da doença, e nesses podemos incluir o status imunológico do hospedeiro, relacionada às interações do seu sistema imune inato e adaptativo, assim como ao estado nutricional e fatores genéticos do mesmo (BRITO *et al.*, 2012; MACEDO *et al.*, 2012; BRELAZ *et al.*, 2012; CASTELLANO *et al.*, 2009; REITHINGER *et al.*, 2007). A infecção por *L. (V.) braziliensis* pode apresentar variadas formas clínicas (desde formas assintomáticas até formas cutâneas e mucocutâneas), imunológicas e histopatológicas.

A forma cutânea é a manifestação mais comum na LTA, caracterizada por uma ou poucas úlceras com bordas elevadas variando em tamanho e geralmente em áreas expostas do corpo, como pernas e braços (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2012; GOTO; LINDOSO, 2010; MACEDO *et al.*, 2012). Pode evoluir para cura espontânea e/ou para a forma mais severa, com acometimento de mucosas, sendo relativamente refratária ao tratamento. No entanto, a evolução da doença é semelhante com início no ponto de inoculação das formas promastigotas infectantes. Após uma incubação, que geralmente varia de dias até meses, um pequeno nódulo ou pápula eritematosa aparece, algumas vezes acompanhada de linfadenomegalia. Essa lesão inicial pode se curar espontaneamente, obtendo um aspecto de pergaminho, ou evoluir, usualmente após alguns meses, para uma doença estabelecida com diferentes formas clínicas onde infecções bacterianas secundárias são comuns. (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GONZALEZ *et al.*, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010;) (Figura 4)

As lesões cutâneas apresentam-se nas formas localizada, caracterizada por lesão em áreas expostas do corpo, variando de 1 até 10; disseminada, com numerosas lesões pleomórficas em partes do corpo contínuas ou não, variando em número de 10 à 300; e difusa, forma anérgica da doença caracterizada por lesões nodulares ou papulosas sobre todo o corpo, sendo graves, deformantes e sem cura clínica. Já a leishmaniose mucocutânea, forma mais agressiva e mutilante, apresenta lesões infiltrativas, com ulcerações e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe e laringe (AMEEN, 2010; DESJEUX, 2004; GOTO; LINDOSO, 2010) (Figura 4).

Figura 4- Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

Legenda: 1) forma cutânea localizada; 2) forma cutânea localizada com infecção bacteriana secundária; 3) forma cutânea disseminada; 4) forma cutânea difusa; 5) forma mucocutânea; 6) Cicatriz característica.

Fonte: Figura 1 e 3: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana (2007); Figura 2: Da autora; Figura 4: MEHTA *et al* (2009); Figura 5: Calvopina *et al* (2006); Figura 6: OMS (2007).

3.3 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

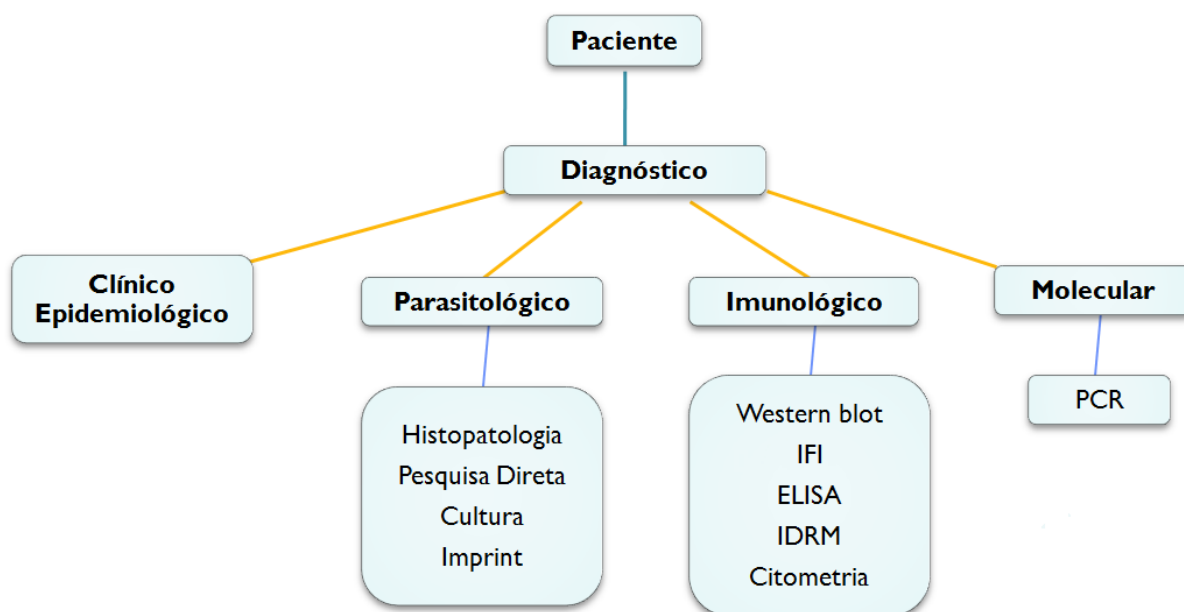
O diagnóstico da LTA tradicionalmente é feito pela demonstração do parasita através do exame histopatológico, da pesquisa direta e/ou “*imprint*” para identificar amastigotas. Pode ainda ser feito através da cultura *in vitro* e *in vivo* para identificação e caracterização da espécie de *Leishmania* por análises enzimáticas ou PCR (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010; VEGA-LOPEZ, 2003). No entanto, nem sempre é possível se observar as *Leishmanias*, principalmente em lesões crônicas e naquelas com poucos parasitos (AMEEN, 2010; VEGA-LOPEZ, 2003). Como não existe uma ferramenta única e universal para o diagnóstico da LTA, o mesmo envolve a associação de aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (GOTO; LINDOSO, 2010; VEGA-LOPEZ, 2003) (Figura 5). O diagnóstico clínico é feito com base nas características da lesão associadas a anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente na pesquisa de parasitos através das técnicas citadas acima e/ou da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA parasitário. Também são realizados testes sorológicos, que proporcionam a detecção de anticorpos circulantes específicos contra antígenos parasitários, fornecendo parâmetros indiretos para o diagnóstico. Os testes sorológicos incluem a reação de imunofluorescência indireta (IFI), ELISA e Western Blot, em geral, apresentando resultados satisfatórios. Para o diagnóstico laboratorial utiliza-se ainda a Intradermoreação de Montenegro (IDRM) na avaliação da imunidade mediada por células. A IDRM é considerada positiva quando se observa uma endureção local maior ou igual a 5 mm após 48-72 horas de inoculação do antígeno de *leishmania* no antebraço do paciente. Esse é um teste útil para estudos epidemiológicos e para determinar prevalência da infecção em uma região (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

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

(OLIVEIRA *et al.*, 2013) demonstrou uma performance semelhante entre a IFI e o diagnóstico por citometria, no entanto com a citometria sendo uma melhor alternativa para se avaliar o critério de cura na LTA.

Visto o 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; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020; REITHINGER *et al.*, 2007).

Figura 5- Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana



Fonte: Laboratório de Imunogenética-CpqAM/FIOCRUZ (2007)

3.4 Tratamento e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana

Embora a doença não seja fatal na maioria dos casos e possa evoluir espontaneamente para cura, o tratamento de leishmaniose cutânea é feito para acelerar a cura, para reduzir a cicatriz, especialmente em locais como a face, e para

prevenir a disseminação da doença e sua evolução para formas mucosas. O objetivo da quimioterapia com a cicatrização das lesões é a eliminação dos parasitos através da sua destruição direta ou aumento da capacidade do hospedeiro em cicatrizar, onde a resposta imune é a chave para o sucesso (AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; REITHINGER *et al.*, 2007)

Os antimoniais pentavalentes (Sbv) foram desenvolvidos em 1945, e são drogas consideradas de primeira escolha para o tratamento da LTA causada por diferentes espécies. Essas drogas estão disponíveis em duas formulações: antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®). No entanto, ambas apresentam efeitos tóxicos e colaterais que podem ser severos (CROFT *et al.*, 2006; REITHINGER *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; TIUMAN *et al.*, 2012). No Brasil, o tratamento primariamente é feito com o Glucantime®, fornecido gratuitamente pelo governo. As drogas consideradas de segunda escolha são a anfotericina B e a pentamidina, ambas requerendo um maior tempo de administração parenteral para que seja atingida a cura (TIUMAN *et al.*, 2012; BRASIL, 2007; SANTOS *et al.*, 2008). É importante destacar que não existe um único e efetivo tratamento para todas as espécies de *Leishmania*, e que esse é feito baseado na localização geográfica, espécie infectante, disponibilidade e custo de drogas e na quantidade de lesões do paciente (GONZALES *et al.*, 2009; AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; RODRIGUEZ-PINTO *et al.*, 2012).

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). A presença de infecções helmínticas é comum em áreas rurais do Brasil, e trabalhos indicam a capacidade dos helmintos em modular a resposta imunológica, direcionando-a para um perfil Th2 e para expansão de células Treg (MAIZELS, 2005; ARAÚJO, 2004). Segundo estudos, pacientes infectados com helmintos demoram mais tempo para se curar quando infectados por LTA (O'NEAL, 2007), no entanto, NEWLOVE *et al.* (2011) demonstrou que a utilização de terapia anti-helmintos precoce não melhorou a resolução clínica da doença.

Os efeitos colaterais dos tratamentos são variáveis, e usualmente reversíveis. Eles compreendem dores muscoesqueléticas, artralgia, anorexia, náusea, vômito,

dores de cabeça, febre, urticária, tosse, leucopenia leve, trombocitopenia entre outros. Efeitos colaterais mais severos incluem pancreatite, falência renal, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade. Outras dificuldades que podem ser apontadas no tratamento incluem a via de administração da droga (geralmente parenteral, o que favorece a evasão pelos pacientes), a toxicidade e o aumento da resistência às drogas existentes. Dessa maneira, todos os pacientes devem ser monitorados por exames bioquímicos, hematológicos e eletrocardiograma. Todos esses fatos limitam o uso das drogas em diversos grupos de pacientes, incluindo crianças pequenas, idosos, pacientes grávidas, pacientes com problemas hepáticos, renais e aqueles com outras doenças crônicas (GONZALEZ *et al.*, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010; KEDZIERSKI, 2010; REINTHINGER *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; TIUMAN, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010). Sendo assim, estudo para o desenvolvimento de novos fármacos candidatos à terapêutica ou que a complementem, além dos estudos para o desenvolvimento de vacinas são essenciais.

Atualmente existem também outras linhas de tratamento, com drogas alternativas como a Miltefosina, originalmente utilizada para tratar câncer, e que vem sendo utilizada para tratar a LTA com relativo sucesso - sendo o primeiro tratamento oral aprovado em alguns países (CROFT, *et al.*, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; SANTOS *et al.*, 2008, TIUMAN *et al.*, 2012). Alguns estudos também demonstram a importância do fluconazol, cetoconazol, itraconazol e outros agentes antifúngicos, para o tratamento da leishmaniose, mas ainda com resultados controversos (CROFT *et al.*, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006). Outros autores relatam a utilização de paramomicina, azitromicina, antibióticos tópicos, do imunomodulador tópico imiquimod, e do antimonial intralesional, cujas eficácias variam amplamente (AMEEN, 2010; CROFT *et al.*, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006; SANTOS *et al.*, 2008). Por fim, sabe-se que as formas promastigotas de *Leishmania* são termosensíveis e, por isso, o tratamento com frio/calor vem sendo empregados, utilizando técnicas como lâmpadas infravermelhas ou com luz ultravioleta, e/ou crio cirurgias com CO₂ ou nitrogênio líquido (CROFT *et al.*, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006). Todos esses estudos ainda precisam de maiores investigações para assegurar sua eficácia e eficiência (AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006; SANTOS *et al.*, 2008).

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 imunoprolifáticos. 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; MACEDO *et al.*, 2012; 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).

Na leishmaniose a cura da doença é estabelecida por critérios clínicos, que envolvem a completa cicatrização das lesões ulceradas com sua epitalização e regressão total do infiltrado celular, segundo critérios do Ministério da Saúde. A resolução da doença resulta em uma cicatriz permanente e característica que, dependendo do tamanho e localização, podem causar trauma significativo no indivíduo afetado (REINTHINGER *et al.*, 2007). É recomendado o acompanhamento

mensal do paciente durante três meses consecutivos após a conclusão do esquema terapêutico. Casos que não cumprem integralmente os parâmetros acima devem ser mantidos em observação por seis meses (BRASIL, 2007). Após a cura clínica, deve-se acompanhar o paciente por até 12 meses após o tratamento (BRASIL, 2007). A cicatrização geralmente confere ao indivíduo proteção contra reinfecção, podendo essa ser restrita ou não a mesma espécie de *Leishmania* spp. Há casos que se curam espontaneamente, algumas vezes com uma evolução clínica inferior a três meses de infecção. Sendo assim, é particularmente relevante o estudo dos mesmos, já que é sugerido que eles desenvolvam resposta imune protetora (BRASIL, 2007; BRITO *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 1995; REITHINGER *et al.*, 2007).

O controle da LTA deve envolver estratégias distintas que incluem: vigilância epidemiológica, com identificação precoce dos casos e tratamento, incluindo nos casos de coinfeção com HIV; medidas de atuação na cadeia de transmissão, identificando o agente etiológico e vetor predominantes e impedindo a infecção de vetores e hospedeiros; medidas educativas, incluindo a utilização de proteção individual e distanciamento das construções em relação à mata; medidas administrativas, como saneamento e melhorias das condições habitacionais, além de melhor capacitação dos profissionais de saúde; e por fim o desenvolvimento de uma vacina eficiente e operacional (BRASIL, 2010; CLEM, 2010; DESJEUX, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010, 2012).

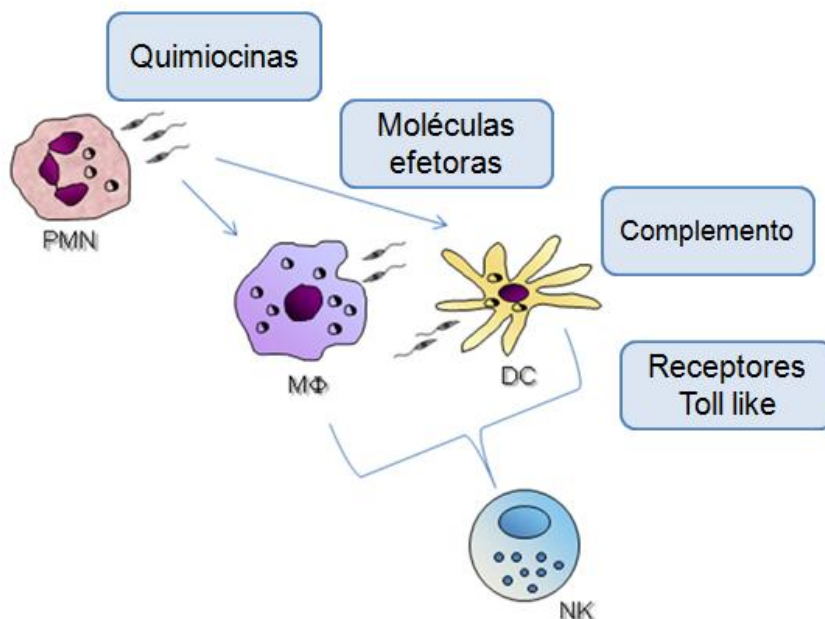
3.5 Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana

A imunidade contra a *Leishmania* é mediada através de uma complexa rede de parâmetros imunológicos, incluindo a resposta imune inata e adaptativa (DUTHIE *et al.*, 2012). A resposta imunológica desempenha um importante papel na cura clínica da doença ou na sua progressão (SOUZA *et al.*, 2013). Dessa maneira, a presença de células efectoras, como macrófagos, células NK, linfócitos T, assim como de citocinas, moléculas efectoras e anticorpos específicos é crítica para o controle ou desenvolvimento da leishmaniose (BIRNBAUM; CRAFT, 2011; LIESE *et al.*, 2008, OGHUMU *et al.*, 2010).

Grande importância tem sido dada aos eventos iniciais da resposta imune na LTA, com destaque ao papel da imunidade inata no direcionamento da imunidade adaptativa (KEDZIERSKI, 2010; STENGER, RÖLLINGHOFF, 2001). Estudos indicam os neutrófilos como uma das primeiras células a chegar ao local da infecção, rapidamente penetrando na pele após a infecção e sendo infectados pelas *leishmanias* (PETERS; SACKS, 2009; RITTER *et al.*, 2004). Os neutrófilos têm papéis protetores e patogênicos a eles atribuídos. Se por um lado rapidamente chegam ao local de infecção e promovem atividade parasiticida, também podem ser considerados como “cavalos de tróia”, uma vez que facilitam a infecção silenciosa dos macrófagos ao fagocitarem neutrófilos contaminados, além de secretarem citocinas antiinflamatórias (BIRNBAUM; CRAFT, 2011; NYLEEN; GAUTAM, 2010; PETERS *et al.*, 2008; RITTER *et al.*, 200) (Figura 6).

Os macrófagos são as principais células do sistema imune responsáveis pela morte do parasito, através da produção de citocinas, óxido nítrico e intermediários reativos do oxigênio. No entanto em infecções por leishmania as atividades microbidas dos macrófagos ficam comprometidas, levando sobrevivência e proliferação do parasito (BIRNBAUM; CRAFT, 2011; SRIVASTAVA *et al.*, 2012). Junto com os fagócitos, as células NK representam a primeira linha de defesa contra os patógenos através da via citolítica e também da produção de citocinas pró inflamatórias, como IFN- γ e TNF (NYLEEN; GAUTAM, 2010; PINHEIRO, 2004). Além desses mecanismos de resposta imune inata, têm-se também o sistema complemento, que desempenha papel pró-inflamatório, sendo ativado pela via clássica e alternativa na leishmaniose (MAURER *et al.*, 2009) (Figura 6).

Na LTA, a resolução da infecção está associada à apresentação de antígenos de *Leishmania* por macrófagos e células dendríticas, que também secretam citocinas e quimiocinas, resultando em um direcionamento da diferenciação das células T (STENGER; RÖLLINGHOFF, 2001). Um importante componente para ligação da resposta imune inata e adaptativa são as células dendríticas. Elas são as responsáveis pelo reconhecimento da infecção parasitária e apresentação celular dos parasitos e/ou seus antígenos, e sua produção inicial de IL-12 é essencial para o início de uma resposta imune protetora em camundongos (JOHN; HUNTER, 2008; KEDZIERSKI, 2010; NYLEEN; GAUTAM, 2010). As células dendríticas dermais infectadas rapidamente adquirem um fenótipo maduro para apresentação e ativação de linfócitos T (NYLEEN; GAUTAM, 2010). (Figura 6).

Figura 6 - Principais componentes da resposta imune inata contra a *Leishmania* spp.

Legenda: PMN= Polimorfonucleares; MΦ= Macrófagos, DC= Células dendríticas, NK= Células exterminadoras naturais.

Fonte: Adaptado de Souza *et al.* (2013)

Os parasitos são capazes de utilizar diferentes mecanismos do sistema imunológico para impedir sua eliminação, evitando a ativação macrofágica e também o seu reconhecimento pelos linfócitos T. Esses mecanismos incluem a entrada “silenciosa” nos fagócitos utilizando receptores como o CR1 (CD35) ou o da fosfatidilserina; inibição direta da função dos macrófagos por interferir na transcrição do NF- κ B e na produção de IL-12; diminuição da expressão do MHC classe II, inibição de citocinas como IL-12 e estímulo para produção de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β (CUNNINGHAM, 2002; JOHN; HUNTER, 2008; KEDZIERSKI, 2010; MAURER *et al.*, 2009; NYLEEN; GAUTAM, 2010).

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

uma doença auto-limitada quando infectadas com *L. major* ou *L. tropica*, enquanto linhagens susceptíveis, como BALB/c, apresentam uma doença progressiva e severa (REIS *et al.*, 2006; ROBERTS, 2006).

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

Na leishmaniose humana e experimental, a imunidade é predominantemente mediada por linfócitos T (SOUZA *et al.*, 2013). Os linfócitos T desempenham seu papel gerando células T específicas e de memória, além de produzirem citocinas que direcionam respostas protetoras ou não em infecções por parasitas intracelulares (CUMMINGS *et al.*, 2010; SHARMA; SINGH, 2009). Através de identificação desses subtipos, pode-se especificamente enumerar e caracterizar aqueles que são cruciais em cada etapa de uma infecção (DE ROSAL *et al.*, 2003). 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). Nesse contexto, estudos imunofenotípicos têm sido associados com os eventos de resistência e susceptibilidade a LTA (BOTTREL *et al.*, 2001; DA-CRUZ *et al.*, 1994; KEMP *et al.*, 1992; ALMEIDA *et al.*, 2011; BRELAZ *et al.*, 2012).

Células T CD4⁺ e CD8⁺ atuam como fonte produtora de citocinas envolvidas no processo de ativação de macrófagos na LTA, e diferentes grupos (COUTINHO *et al.*, 2002; BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012; DA-CRUZ *et al.*, 2002) propuseram que no processo de cura após terapêutica é importante um balanço entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Os linfócitos T CD8⁺ são associados com a cura da doença em humanos e em modelos animais. Além de produzirem citocinas como IFN- γ , TNF, IL-4 e IL-10, esses linfócitos participam no controle da leishmaniose através de mecanismos de citotoxicidade, incluindo mecanismos de perforina e granzima e/ou

Fas/FasL. (Ruiz; Becker, 2007) (Figura 7). Estudos indicam ainda que as células T CD8⁺ também podem ter propriedades regulatórias (Carvalho *et al.*, 2012).

A resposta linfocitária na LTA é caracterizada principalmente pelo aumento de células T CD4⁺, onde estão bem descritos o direcionamento para um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (BACELLAR *et al.*, 2002; BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012; KEDZIERSKI, 2010). Na leishmaniose humana, o padrão de resposta imune do tipo 1 com produção de IFN- γ , TNF e IL-12, tem sido associado com o controle da infecção por ativação macrofágica e destruição parasitária (AMEEN, 2010; BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012; ROBERTS, 2006). A citocina IFN- γ atua em sinergia com TNF ativando óxido nítrico sintase (iNOS ou NOS2) a produzir óxido nítrico (NO), resultando na morte intracelular do parasito e controle da doença (BOGDAN *et al.*, 2000; CUMMINGS *et al.*, 2010; NYLEEN; GAUTAM, 2010;). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β , consideradas do tipo 2, favorecem a multiplicação parasitária, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ (GOMES-SILVA *et al.*, 2007). Essas citocinas também são capazes de inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1 e sua consequente produção de IFN- γ e TNF (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007). Os perfis Th1 e Th2 são ainda conhecidos pelos seus fatores reguladores de transcrição T-bet e GATA-3, respectivamente, que ainda fazem regulação cruzada com os outros perfis (DIAZ, *et al.*, 2010) (Figura 7).

Embora a resposta Th1 seja importante para o controle da infecção, vale ressaltar que citocinas Th1 podem também estar relacionadas com a patogênese da doença. Já foi demonstrado que é necessária a existência de um contrabalanço com as células produtoras de citocinas do tipo 2, e não uma polarização para um tipo de resposta, pois esses mecanismos são importantes para manter a integridade tecidual do hospedeiro contra uma subsequente resposta inflamatória (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2006). Além disso, apesar de válido em vários aspectos, a dicotomia Th1/Th2 como indicador de resistência e susceptibilidade é um modelo simplificado, que precisa de revisão, dado que a resposta imunológica parece ser mais complexa do que o que sabemos no momento. Outros subtipos de células T CD4⁺, como células Treg e células Th17 também parecem apresentar papel importante na susceptibilidade e resistência a LTA (GOLLOB *et al.*, 2008; KEDZIERSKI, 2010; NYLÉN; GAUTAM, 2010) (Figura 7).

Estudos têm evidenciado o subtipo celular conhecido como Th17, relacionando-o com a patogênese de doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes

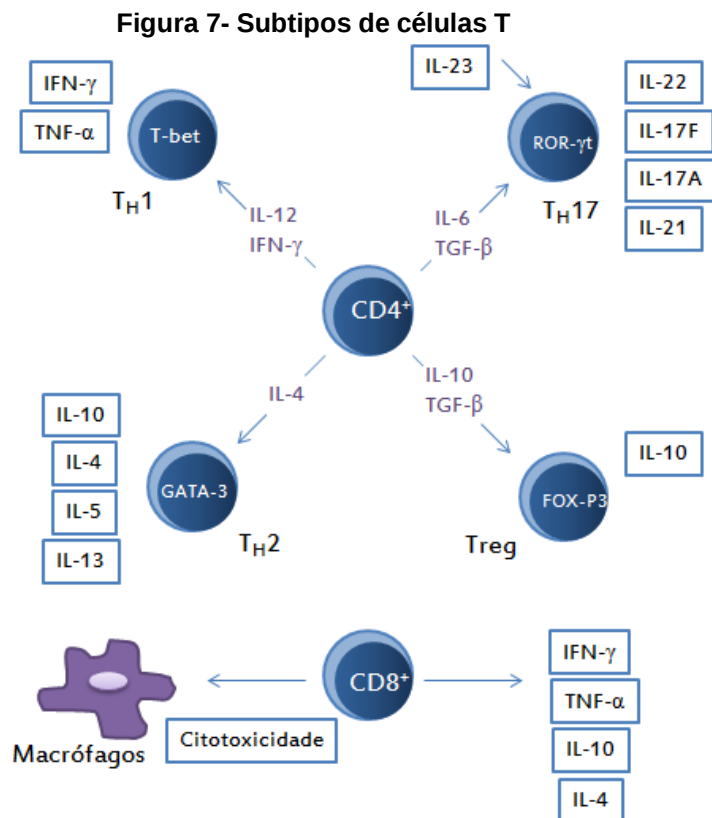
(BETTELLI *et al.*, 2008; OUKKA, 2007; SCHMIDT-WEBER *et al.*, 2007; STOCKINGER; VELDHOEN, 2007). A resposta Th17 é ativada por uma combinação das citocinas IL-6 e TGF- β , além dos fatores de transcrição ROR- γ T, ROR α e Stat3. Esse perfil e sua funcionalidade estão relacionados com as citocinas IL-17, IL-22, IL-21 e IL-6, e a citocina IL-23 ajuda na sua manutenção (BETTELLI *et al.*, 2008; SCHMIDT-WEBER *et al.*, 2007). O perfil Th17 está envolvido no aumento da produção de múltiplos mediadores inflamatórios (como IL-1, TNF, NOS2 e quimiocinas) que estão relacionados às respostas imunes inatas e adaptativas, permitindo a eliminação do patógeno invasor (SOUZA *et al.*, 2013, EASTAFF-LEUNG *et al.*, 2010). Trabalhos desenvolvidos por Bacellar *et al.* (2009), Boaventura *et al.* (2010), Katara *et al.* (2012) indicaram o provável envolvimento do perfil Th17 e da citocina IL-17 no progresso e patogênese da leishmaniose cutânea, mucosa e visceral, respectivamente. Por outro lado, Novoa *et al.* (2011) e Pitta *et al.* (2009) demonstraram papéis protetores nas infecções por *Leishmania tegumentar* e visceral, respectivamente. A resposta Th17 surge provavelmente como uma resposta inicial a um grande número de patógenos que não são bem resolvidos pela resposta do tipo Th1 e que requerem inflamação tecidual mais exacerbada para serem eliminados. As células Th17 podem preencher a lacuna entre a resposta imune inata e adaptativa, e atrair outros tipos de células para o sítio de infecção em estágios mais tardios do processo inflamatório, mas seu papel na LTA ainda não está bem esclarecido (BETTELLI *et al.* 2008) (Figura 7).

Além das células Th17, existem estudos disponíveis na literatura em relação ao papel de células Treg, que aparentam regular a resposta imunológica. Ao que parece, o balanço entre as células Treg e Th17 pode ser essencial para a manutenção do equilíbrio imunológico (DEKNUYDT *et al.*, 2009; EASTAFF-LEUNG *et al.*, 2010).

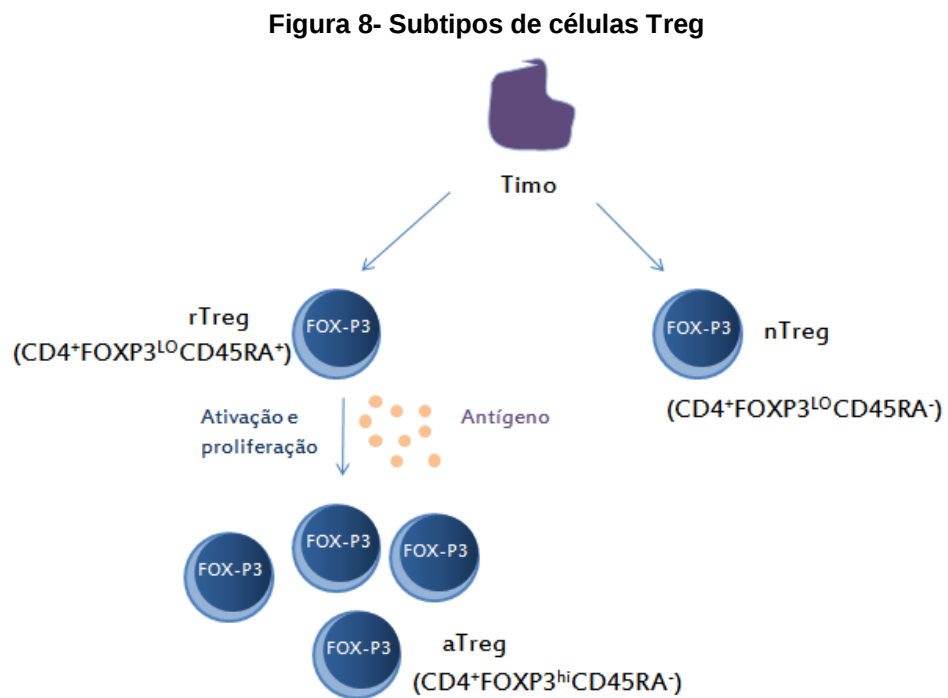
As células Treg (CD4⁺FOXP3⁺) estão envolvidas na tolerância imunológica durante a infecção humana com *Leishmania*. Elas apresentam duas populações com fenótipo específico: Tregs naturais, que se originam no timo, e Tregs induzidas (Tr1, Th3 entre outras), que se desenvolvem a partir de células T CD4⁺ convencionais (BELKAID, 2006, 2007; NYLÉN; GAUTAM, 2010; SOUZA *et al.*, 2013). Além disso, as células CD4⁺FOXP3⁺ também são caracterizadas pela presença de três subpopulações, com fenótipos precisos: CD4⁺FOXP3^{LO}CD45RA⁺ células T em repouso (rTreg), CD4⁺FOXP3^{hi}CD45RA⁻ célula Treg ativadas (aTreg), que

apresentam diferentes estágios de diferenciação e propriedades supressoras *in vitro*, e CD4⁺FOXP3^{LO}CD45RA⁻ células Tregs secretoras de citocinas (nTreg), que não possuem capacidade supressiva (MIYARA *et al.*, 2009) (Figura 8). Essas células Tregs ainda podem expressar marcadores de superfície e/ou secretar diferentes níveis citocinas, de acordo com a sua ativação celular e mecanismos de supressão, como: CTLA-4 (supressão por contato), IL-10 e TGF- β (citocinas supressoras), perforina e granzimas (citólise), CCR4 (Migração tecidual), CCR7 (migração para linfonodo), e CLA (migração cutânea) (VIGNALI *et al.*, 2008; SAKAGUCHI *et al.*, 2010).

Evidências indicando que as Tregs naturais poderiam estar envolvidas no controle da imunidade anti-infecção são provenientes de estudos em diversos modelos de infecção por *Leishmania*, *Plasmodium* e *Schistosoma* (BELKAID *et al.*, 2002, 2007). As Tregs parecem controlar o tênue balanço que é algumas vezes estabelecido entre o patógeno e o hospedeiro, e medeiam um equilíbrio que pode se tornar mutuamente benéfico. Células Treg com funções imunossupressoras e produção de IL-10 foram identificadas em lesões de pele e em PBMC de pacientes com LTA (BOURREAU *et al.*, 2009). No entanto, como foram sugeridos papel na patogênese (BOURREAU *et al.*, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2009; SALHI *et al.*, 2008) e no controle da doença (CAMPANELLI *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-PINTO *et al.*, 2012), sua real função na resolução ou perpetuação nas infecções humanas não está completamente elucidada (DIAZ, *et al.*, 2010;) (Figura 7).



Fonte: Adaptado de Souza *et al.* (2013) e Ruiz;Becker (2007)



Fonte: Adaptado de Battaglia;Roncarolo (2009)

Em relação à resposta imune humoral na LTA, esta é pouco caracterizada, dado que o controle da infecção está relacionado a uma resposta por células T e a correta ativação macrofágica. A intensidade da resposta humoral parece estar relacionada com a carga parasitária e com a cronicidade da infecção, e essa resposta parece exercer algum efeito modulador na resposta imune celular durante a infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Podem ser observados altos títulos de anticorpos em todas as manifestações clínicas da LTA, com todos os subtipos (exceto IgD) sendo detectados. Alguns estudos já demonstraram a produção de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 associados a uma resposta Th1, enquanto que o subtipo IgG4 estava associado a uma resposta Th2, com a frequência de IgG sendo IgG1 > IgG3 > IgG2 = IgG4 (OLIVEIRA *et al.*, 2013; PISSINATE *et al.*, 2008; TRUJILLO *et al.*, 1999). Entretanto, o papel específico dos subtipos na imunidade contra *Leishmania* não está completamente elucidado, mas tem sido útil para o diagnóstico e para predizer *in vivo* a resposta imune celular (CASTELLANO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2005; TRUJILLO *et al.*, 1999).

Um dos grandes desafios dos pesquisadores é a identificação de marcadores imunológicos e moleculares que permitam compreender não apenas processos que levam a formação da lesão na LTA, como também os mecanismos responsáveis pela resistência à doença. A diversidade de mecanismos imunes e citocinas relacionadas à resposta imunológica na LTA destacam a sua complexidade. Sendo assim, o entendimento da resposta imune protetora e patológica na infecção por *Leishmania* é importante para intervenções imunológicas e desenho racional de vacinas. Dessa maneira, a determinação do perfil de citocinas e a contribuição de populações celulares individuais para o ambiente geral da resposta é fundamental para se compreender a resposta imunológica (BOTTREL *et al.*, 2001; BRELAZ *et al.*, 2012; DUTHIE *et al.*, 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização do estudo

O estudo foi do tipo experimental ou ensaio clínico não-randomizado. Foram realizadas comparações entre grupo de pacientes com LTA apresentando lesão ativa e pacientes com cura clínica, tendo essa sido alcançada após tratamento ou na sua ausência (cura espontânea). Ainda tivemos um grupo formado por sujeitos sem história prévia de LTA, denominado controle. Todos foram escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

4.1.1. Processo de seleção da população estudada

Os pacientes do presente estudo foram procedentes de Moreno, Jaboatão dos Guararapes (Região Metropolitana de Recife- RMR), Vitória de Santo Antão e Vicência (Zona da Mata Pernambucana), áreas endêmica da LTA em Pernambuco. Foram selecionados três grupos de pacientes: portadores de lesões ativas, apresentando seu primeiro caso de leishmaniose e com idade superior a 13 anos; pacientes com cura clínica após seis meses de tratamento; e pacientes após cura clínica espontânea, ou seja, sem a realização de tratamento quimioterápico e curados das suas lesões. Para a seleção de pacientes com LTA ativa, foram observados os seguintes critérios: apresentação de uma ou mais lesões cutâneas ativas e ausência de tratamento quimioterápico prévio. Todos os pacientes tiveram o diagnóstico confirmado por critérios clínicos, epidemiológicos e ao menos dois testes laboratoriais. Os pacientes receberam atendimento no ambulatório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), onde foram esclarecidos do objetivo do estudo e foram acompanhados para realização de procedimentos para coleta de 40 ml de sangue antes e após tratamento quimioterápico com Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina), ou após a cura clínica espontânea, sob orientação médica. O critério de cura clínica para os pacientes tratados ou curados espontaneamente foi estabelecido considerando-se a completa cicatrização da lesão.

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

O grupo controle foi constituído por indivíduos considerados saudáveis, residentes em área não endêmica, não-receptores de transfusão sanguínea e sem história prévia da doença. O tratamento quimioterápico foi realizado nos postos de saúde dos municípios deste estudo, utilizando-se o Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina) administrado por via intramuscular. O tratamento foi feito em ciclos de 20 a 30 dias em doses diárias de 20 mg/Kg com intervalo de 10 dias entre cada série. Os pacientes foram submetidos a nova série do tratamento de acordo com o processo de cicatrização de cada indivíduo.

O material coletado foi processado no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, na cidade de Recife-PE.

4.1.2. Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes

Além da avaliação clínica e epidemiológica, os pacientes foram submetidos a alguns procedimentos laboratoriais para confirmação da doença em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmaniose do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ) e com o Instituto Nacional de Saúde e Pesquisa Médica da França (INSERM). Os exames incluíram: Intradermorreação de Montenegro (IDRM); pesquisa direta através de escarificação da borda da lesão; biópsia em borda da lesão ativa com *punch* (4-6mm de diâmetro); reação em cadeia de polimerase (PCR) segundo os primers de DE BRUIJN; BARKER (1992) e método de SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS (1989); reação de imunofluorescência indireta (IFI); citometria de fluxo e Western blot.

4.2 Considerações éticas

Os procedimentos para coleta de sangue foram realizados somente após o paciente concordar em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (Apêndice A e B). O grupo controle foi constituído por voluntários saudáveis, residentes em área não endêmica, somente após os mesmos concordarem em assinar o TCLE (Apêndice C). Foram coletados 40 ml de sangue dos grupos de pacientes e controles. Esse projeto faz parte de dois projetos aprovados pelo Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ sob os números 60/05 e 01/10 e com Registros no CAEE 0757.0.095.000-05 e 00082.0.095.000-09 (Anexo A e B, C)

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

Formas promastigotas (cepa MHOM/BR/75/M2903), cultivadas *in vitro*, foram expandidas em meio de cultura Schneider's (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; 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 800x g, por 15 minutos, a 4°C. O sedimento resultante foi armazenado a –20°C até o momento do uso.

Para a obtenção dos antígenos solúvel e insolúvel, as alíquotas estocadas foram descongeladas, ressuspensas em água destilada contendo inibidores de proteases (metil-fenil-fluoreto – PMSF, 0,01mM e ácido etilenodiaminotetracético – EDTA, 2mM; Sigma, St. Louis, MO) 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 10.000xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e submetido a uma nova centrifugação a 100.000xg durante uma hora, à mesma temperatura. O sobrenadante resultante foi a fração antigênica solúvel enquanto que o sedimento foi a fração antigênica insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. Ambos foram submetidos a uma dosagem protéica segundo o método de Bradford

(1976) modificado por Read & Northcote (1981), além de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). No gel de SDS-PAGE as frações apresentaram proteínas cujos pesos moleculares variaram entre 66 e 16 kDa, aproximadamente, quando comparadas ao peso molecular padrão (Sigma, St. Louis, MO), conforme apresentado em Brelaz-de-Castro *et al.* (2012) presente na seção Resultados e Discussão, Artigo 1. Após esses procedimentos, as frações antigênicas foram armazenadas a -20°C até a utilização nos ensaios de cultura celular (BRITO *et al.*, 2000).

4.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Quarenta mililitros (40ml) de sangue foram coletados utilizando-se o sistema a vácuo. O sangue foi diluído em PBS pH 7,2 na proporção 2:1 e transferido para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia), também na proporção 2:1. Após centrifugação, a $400 \times g$ por 30 minutos a 20°C , foi obtida uma camada de PBMC. As células foram lavadas duas vezes com 20 ml de PBS pH 7.2 e submetidas a nova centrifugação a $300 \times g$ por 15 minutos a 20°C . Depois do descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e $100\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). Uma alíquota da suspensão celular foi então removida, diluída em azul de trypan (Sigma, St. Louis, MO) e quantificada em câmara de Neubauer, sendo feito o ajuste celular para o ensaio.

4.5 Ensaios de citometria de fluxo

4.5.1. Ensaio de imunofenotipagem em sangue periférico (T CD4^{+} e T CD8^{+})

Para determinação da percentagem de células CD4^{+} e CD8^{+} , 5ml de sangue periférico dos pacientes e 5ml de sangue periférico dos indivíduos do grupo controle,

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

4.5.2. Ensaio de imunofenotipagem em PBMC (Th1, Th2 e Th17)

Para determinação das populações Th1 e Th2 responsáveis pela produção de citocinas intracelulares específicas, PBMC (4×10^6 cels/ml) foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (SBF) por 48 horas (determinado após prévia padronização), em estufa (5% CO₂/37°C), na presença das frações antigênica solúvel (SOL, 1.25µg/ml) e insolúvel (INS, 2.5µg/ml) de *L. (V.) braziliensis*, obtidas de acordo com item 4.3. Para determinação da população Th17, Th1 e Th2 as PBMC (5×10^5 células /ml) foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (SBF) por 6 horas (determinado após padronização), em estufa (5% CO₂/37°C), na presença de acetato de forbol miristato (PMA, 25 ng/ml)/ionomicina (1 µg/ml). Brefeldina A (10 µg/ml) foi adicionada por 4 horas antes do término da cultura para assegurar a retenção da citocina no interior celular. Após a incubação, adicionou-se diretamente às culturas ácido etilenodiaminotetraético (EDTA, 20 mM, Sigma, St. Louis, MO) com incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram então lavadas em solução salina contendo 0,5% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma, St. Louis, MO) e 0,1% de azida sódica (Sigma, St. Louis, MO), uma solução denominada de PBS-W, centrifugadas (370 x g, 7 minutos) e transferidas para tubos de poliestireno. Nos tubos estavam os anticorpos monoclonais de superfície anti-CD3, -CD4 e -CD8, e as células foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente. Passado esse período as células foram fixadas

com solução salina contendo 1% de paraformaldeído por 10 minutos, lavadas por centrifugação (370 x g, 7 minutos) com PBS-W e permeabilizadas com PBS-W mais 0,5% de saponina. Logo em seguida, foram lavadas com PBS-W por centrifugação (400 x g, 5 minutos), e então incubadas com os anticorpos monoclonais anti-IFN- γ , anti-TNF, anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL17, anti-IL21, anti-IL22 e anti-IL23. Após incubação, as células foram lavadas com PBS-W por centrifugação (400 x g, 5 minutos), e resuspendidas em salina contendo 1% de paraformaldeído ou PBS-W (no caso das culturas de 6h). As amostras foram analisadas (20 mil eventos/tubo) em citômetro de fluxo (FACSCalibur- BD Bioscience) usando o software “Cell Quest Pro” (BD Bioscience) para aquisição e para análise os mesmo e o software FlowJo 7.6.5 (®Tree Star Inc.).

4.5.3. Marcação *ex vivo* de linfócitos Treg

Para determinação das populações de células Treg *ex vivo*, PBMC (10^6 células/ml) foram suspensas em PBS-W e marcadas com os anticorpos de superfície anti- CD4, CD25, CD45RA, CLA, CCR4, CCR5, CCR7 por 30 minutos a TA. Em seguida as células foram processadas baseado no protocolo do “Human FoxP3 Buffer Set” da BD Pharmigen (San Diego, CA). Após a incubação, as células foram lavadas com 2 ml de PBS-W por centrifugação (400xg, 5 minutos, TA), ressuspendidas com 1 ml do Buffer A e incubadas por 10 minutos, seguida de centrifugação (400xg, 5 minutos, TA) e nova lavagem por centrifugação com PBS-W (400xg, 5 minutos, TA). Logo após foi feita a adição aos tubos de 250uL do tampão C, com incubação de 30 minutos (TA, ao abrigo da luz) e seguido por duas lavagens por centrifugação com PBS-W (400xg, 5 minutos, TA). Por fim, as células foram marcadas com os anticorpos intracelulares anti- FOXP3, IL-10 e CTLA-4, incubadas por 30 minutos (TA, ao abrigo da luz), lavadas por centrifugação e ressuspendidas em PBS-W. As amostras foram analisadas (>20 mil eventos/tubo) em citômetro de fluxo (FACSCalibur- BD Bioscience) usando o software “Cell Quest Pro” (BD Bioscience) para aquisição e para análise o software FlowJo 7.6.5 (®Tree Star Inc.).

4.5.4. Estratégia de análise na citometria de fluxo

As análises foram realizadas inicialmente delimitando-se a região linfocitária no gráfico de Dispersão Frontal (FSC) versus Dispersão lateral (SSC) (Figura 9- PBMC e Figura 10- Sangue periférico). A partir dessa região os gráficos de fluorescência (FL1 x FL2, FL2 x FL3, FL3 x FL4) e respectivos histogramas foram construídos, delimitando-se os quadrantes/regiões de análise (figura 11). Os limites dos quadrantes foram sempre baseados na população negativa e titulações dos anticorpos. Os valores considerados para análise da fluorescência foram os do percentual da região linfocitária para cada quadrante e ou/histograma. As estratégias de análise para cada uma das populações está descrita nas Figuras 11-13.

Figura 9- Exemplo de gráfico de FSCxSSC em PBMC com delimitação na região linfocitária.

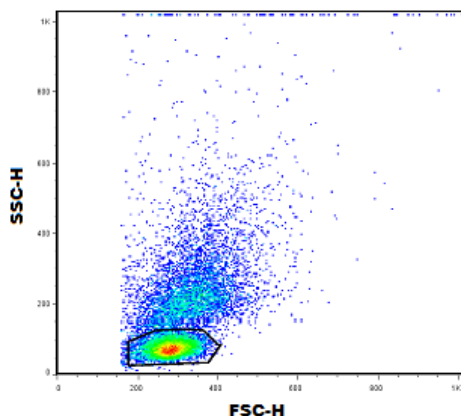


Figura 10- Exemplo de gráfico FSC x SSC em sangue periférico com delimitação na região linfocitária

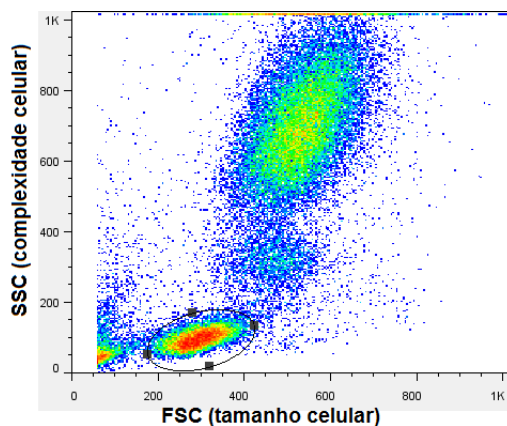
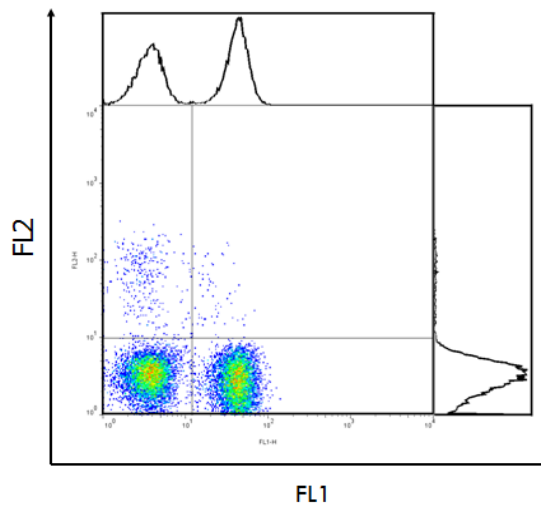
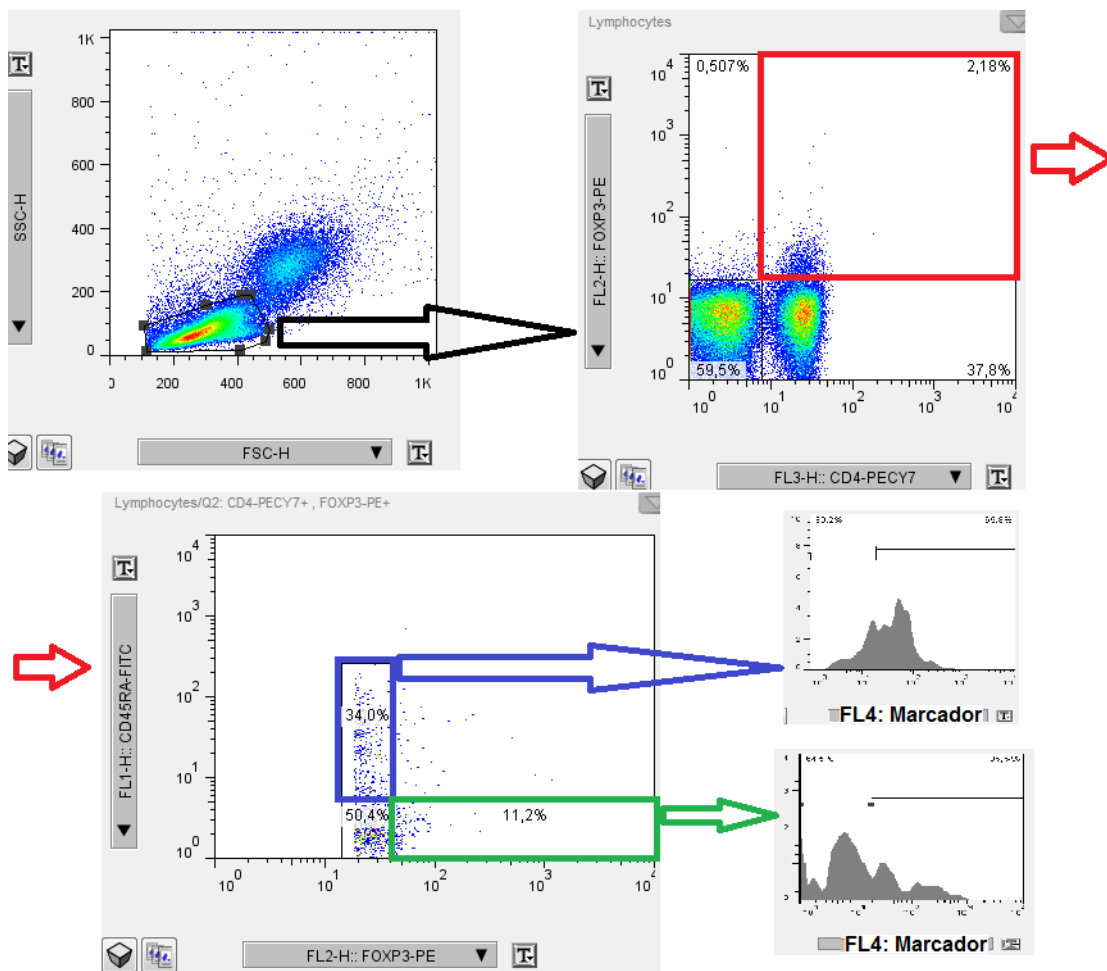


Figura 11- Gráfico de fluorescência (FL1xFL2) e respectivos histogramas utilizado para avaliar o percentual de linfócitos T produtores de citocinas na citometria de fluxo.



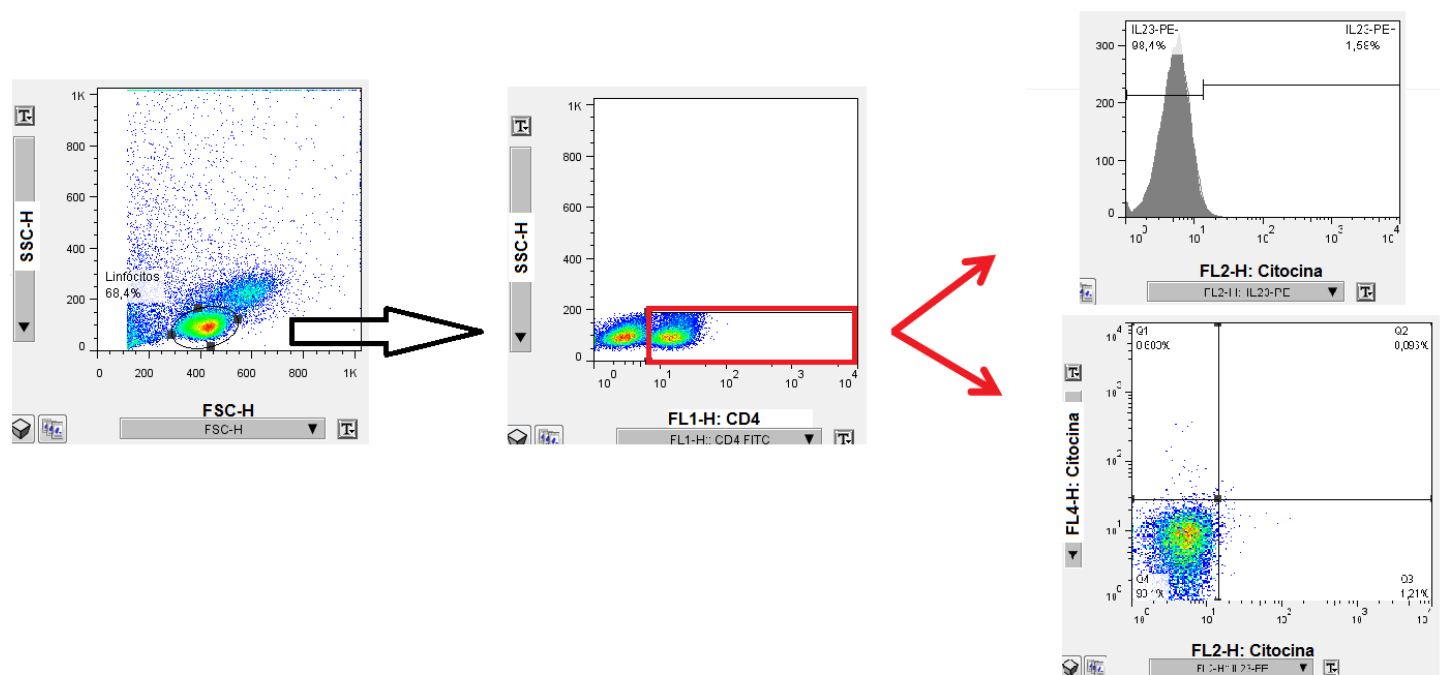
Nota: Estratégia de análise para se avaliar as populações Th1xTh2.

Figura 12- Estratégia para análise de linfócitos Treg e seus marcadores na citometria de fluxo.



Nota: Dados obtidos com o Software FlowJo

Figura 13- Estratégia para análise de linfócitos Th17 produtoras de citocinas na citometria de fluxo.



4.5.5. Anticorpos monoclonais utilizados nas marcações por citometria de fluxo

Os anticorpos utilizados nesse estudo foram adquiridos das empresas BD Pharmigen (San Jose, CA), Ebioscience (San Diego, CA), Miltenyi (Bergisch Gladbach, Germany) e R&D (Minneapolis, MN), estando listados na tabela 2.

Tabela 2- Lista de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de citometria de fluxo

Anticorpo anti-	Fluorocromo	Clone	Isotipo
FOXP3	AF647	259D/C7	IgG1k de camundongo
CD25	APC	M-A251	IgG1k de camundongo
CCR7	APC	3D12	IgG2a de camundongo
CCR4	APC	205410	IgG2β de camundongo
CCR5	APC	3A9	IgG2a κ de rato
CD4	APC	RPA-T4	IgG1k de camundongo
CD14	APC	Tük4	IgG2a de camundongo

Anticorpo anti-	Fluorocromo	Clone	Isotipo
IL-22	APC	IL22JOP	IgG2k de rato
IL17	APC	EBio64DEC17	IgG1k de camundongo
CTLA-4	APC	BNI3	IgG2k de rato
CD3	FITC	UCTH1	IgG1k de camundongo
CD4	FITC	RPTA-T4	IgG1k de camundongo
CD45RA	FITC	HI100	IgG2 β de camundongo
CD8	FITC	BW135/80	IgG2a de camundongo
CD16	FITC	VEP13	IgM de camundongo
CLA	PE	HECA-452	IgM de rato
IL-4	PE	8D4-8	IgG1k de camundongo
IL-17	PE	EBio64DEC17	IgG1k de camundongo
IL-21	PE	eBio3a3-n2	IgG1k de camundongo
IL-23/IL-12	PE	eBioHP40	IgG1k de camundongo
IFN- γ	PE	45-15	IgG1k de camundongo
IFN- γ	PE	45.B3	IgG1k de camundongo
FOXP3	PE	259D/C7	IgG1k de camundongo
IL-10	PE	JES3-9D7	IgG1 de rato
TNF	PE	cA2	Human IgG1
CD56	PECy7	B159	IgG1k de camundongo
CD3	PECy7	UCTH1	IgG1k de camundongo
CD4	PECy7	RPTA-4	IgG1k de camundongo
IFN- γ	PECy7	45.B3	IgG1k de camundongo
IL-4	PECy7	8D4-8	IgG1k de camundongo

4.5.6. Avaliação da concentração de citocinas no soro de pacientes com LTA

As citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A foram mensuradas em soro de 30 pacientes antes do tratamento e 14 controles. Foi utilizado o kit CBA humano Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, Catálogo #560484, BD Bioscience, San Jose, CA) e segundo recomendações do fabricante. Os limites de detecção das citocinas, segundo o fabricante, são: IL-2- 2,6 pg/ml; IL-4- 4,9 pg/ml; IL-6- 2,4 pg/ml; IL-10- 4,5 pg/ml; TNF- 3,8 pg/ml; IFN- γ - 3,7 pg/ml; IL-17A- 18.9 pg/ml. A aquisição dos dados foi feita através do citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) e as análises através do software FCAP Array v1.0 (Soft Flow Inc).

4.6 Cultura celular, isolamento de RNA e síntese do cDNA

PBMCs (10^6 céls/ml) foram incubadas com o antígeno solúvel (SOL, 1.25 μ g/ml) e insolúvel (INS, 2.25 μ g/ml) de *Leishmania* por 24 horas (37°C/ 5% CO₂) em placas de cultura de 24 poços (TPP Trasadingen, Switzerland). O RNA total foi isolado das PBMC usando uma solução de TRIzol (Life Technologies Carlsbad, CA) de acordo com as recomendações do fabricante. A pureza do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose seguida de coloração com brometo de etídio. A densidade óptica 260/280 (acima de 1.8) e a quantificação do RNA foram realizadas com um espectrofotometro NanoDrop™ (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) e o RNA foi mantido a -80°C até o momento da sua utilização em ensaios de transcrição reversa.

As amostras de RNA de pacientes e controles foram ajustadas para uma concentração de 100ng/ μ l, e a reação de transcrição reversa (RT-PCR) foi feita através do kit “TaqMan® Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystems, Foster City, CA. Catalog #N8080234), segundo o protocolo do fabricante. A RT-PCR foi realizada em volume final de 50 μ l, contendo TaqMan RT Buffer 1x, MgCl₂ 5,5mM, Mix de dNTPs 500 μ M, hexâmeros randômicos 2,5 μ M, inibidor de RNase 0,4 U/ μ L, a enzima *multiscribe reverse transcriptase* 3,125 U/ μ L e 12,375 μ L de amostra. O RNA obtido a partir de PBMC pelo método do TRIzol foi submetido a conversão em cDNA em um termociclador (Eppendorf mastercycler gradient). As condições de

ciclagem foram: dez minutos a 25°C, trinta minutos a 48° C e cinco minutos a 95°C. Controles negativos foram incluídos em cada reação. Após esse período, as amostras foram armazenadas a -20°C até a sua utilização nos ensaios de PCR em tempo real (qPCR).

4.7 PCR real quantitativa por transcrição reversa (RTqPCR)

Para quantificar a expressão de mRNA para as citocinas TNF (Assay ID:00174128_m1), IFN- γ (Assay ID: Hs99999041_m1), IL-10 (Assay ID: Hs00174086_m1) e IL-4 (Assay ID:99999030_m1) nas amostras, foi utilizado o kit real time TaqMan® PCR. Em paralelo, como controle endógeno (gene de referência) da reação foi utilizado RNA ribossomal 18S (kit “TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents”, VIC Probe, SKU# 4319413E). Isso foi feito para normalizar a reação devido a variações do número de células na amostra original, a diferenças na eficiência da extração, para degradação do mRNA no material inicial e para se calcular a eficiência da reação de transcriptase reversa. A qPCR foi realizada utilizando 1 μ L do cDNA como material de início em um volume total de 20 μ L com o TaqMan® Universal PCR Master Mix. Todas as reações foram realizadas no sequenciador ABI PRISM 7500 (PE, Applied Biosystems). A quantificação relativa foi calculada pelo método do Ct comparativo, sendo os valores obtidos normalizados com o gene de referência (Δ Ct). Este cálculo foi feito da seguinte maneira: Δ Ct = Ct (Alvo) – Ct (RNA 18S), onde Ct corresponde ao ponto no gráfico onde a amplificação se torna exponencial. Após a normalização dos valores do gene alvo, o Δ Ct deste foi subtraído do Δ Ct de um elemento calibrador ($\Delta\Delta$ Ct). 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 $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct (amostra) – Δ Ct (calibrador), onde Δ Ct (amostra) corresponde a um parâmetro de interesse a ser relativizado. Obtido o $\Delta\Delta$ Ct, este é aplicado na fórmula $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, obtendo-se assim a quantidade relativa das citocinas.

4.8 Análise estatística

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Artigo 1 (publicado na revista Cellular Immunology, V.279(2): p 180-186)



Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure

Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro  , Amanda Ferreira de Almeida, Andresa Pereira de Oliveira, Marina de Assis-Souza, Lucas Ferreira da Rocha, Valéria Rêgo Alves Pereira

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ), Recife, PE, Brazil

Resumo

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença onde a susceptibilidade ou a resistência é dependente na resposta das células T. Essa é caracterizada por um aumento nos linfócitos T CD4⁺, capazes de induzir perfis opostos de doença, e T CD8⁺, que estão relacionados à imunoproteção. Nós caracterizamos linfócitos T de pacientes antes e após o tratamento quimioterápico, pacientes que curaram espontaneamente e controles, também avaliando a sua produção de citocinas IL-10, IL-4, TNF- α and IFN- γ , após estimulação com as frações antigênicas solúvel/insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. Foi observada a produção de citocinas supressivas na fase inicial da leishmaniose, com a presença significativa de células T CD4⁺, sugerindo a sua conexão com a patogênese da doença. Após a cura, o padrão imunológico observado foi do tipo 1, o que parece estar associado com a cura ou proteção na LTA. Os resultados também demonstraram que ambas as frações induzem uma resposta imune específica, contribuindo para a pesquisa de antígenos relevantes nessa doença.

Abstract

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a disease where susceptibility or resistance is dependent on T cell response. This is characterized by an increased in $CD4^+$ T cells, capable of inducing opposite disease profiles, and $CD8^+$ T cells, that are related to immuno protection. We characterized T lymphocytes from patients before and after treatment, patients that spontaneously healed and controls, also evaluating their production of IL-10, IL-4, TNF- α and IFN- γ , after stimulation with soluble/insoluble antigenic fractions of *L. (V.) braziliensis*. We observed the production of suppressive cytokines in the early phase of leishmaniasis with significant presence $CD4^+$ T cells, suggesting their connection with disease progression. After healing, the immune pattern observed was a type 1 response, what seems to be associated with cure and/or protection in the ACL. The results also showed that both fractions induced a specific immune response, contributing to the search for relevant antigens in this disease.

Key words: American cutaneous leishmaniasis; Immune response; T lymphocyte; Antigen; Flow cytometry; Cytokines.

Cellular Immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (V.) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure.

1. Introduction

Leishmaniasis is considered an emerging and re-emergent disease, with an increase in its incidence in the last decades [1]. It has a global estimated prevalence of 12 million cases, with an estimative of 1.5-2 million new cases each year. At the present moment leishmaniasis occurs in 88 countries throughout Europe, Africa, Asia and America, and 350 million people are at risk of contracting the disease [2, 3]

The American cutaneous leishmaniasis (ACL) is caused by different species of the genus *Leishmania*, and *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent etiologic agent in Latin America, being also the prevailing agent in the Northeast region of Brazil and in the state of Pernambuco [4, 5]. The clinical manifestations are broad and are determined by the species of leishmania, vector virulence factors and host immune response [3, 6]. The pathogenesis is related to the interactions between

the host innate and adaptive immune system, as well as the nutritional status and genetic factors. The disease may vary from asymptomatic forms to cutaneous and mucocutaneous ones [1, 3, 6].

In all ACL clinical forms, T lymphocytes are critical for cure and generation of a protective immune response, also being responsible for the disease persistence and pathology [7, 8, 9]. CD4⁺ and CD8⁺ T cells act producing biologically relevant cytokines for the activation of monocytes and macrophage. In human leishmaniasis, the type 1 immune response, with the production of IFN- γ , TNF- α and IL-12, has been associated with infection control, by macrophage activation and parasite destruction [1, 3]. On the other hand, cytokines like IL-4, IL-10 and TGF- β , considered of type 2, favor parasite multiplication, inhibiting NO production by IFN- γ activated macrophages [6, 7, 10]. These cytokines are also able to inhibit T cell differentiation into a type 1 profile and the subsequent production of IFN- γ and TNF [11]. Therefore, the quality of the immune response can influence disease susceptibility and development, with specific activation of T cells (especially multifunctional T cells) contributing to it [12]. However, even though there are studies that helped to clarify the immune mechanisms of disease development and pathology, no clear data is available about what immune response is necessary to control the disease and what is the difference between patients that develop the disease from those that achieve clinical cure (with or without treatment).

We examined in this study the CD4⁺ and CD8⁺ balance *ex vivo* and *in vivo*, and also the intracellular cytokine profile in patients' cells after stimulation with the soluble and insoluble *L. (V.) braziliensis* antigenic fractions. The differences in the immune response and profile of patients before and after treatment, and also of individuals with lesions that spontaneously healed, were investigated together with the capacity of our antigens to elicit it, helping in the development of future vaccines and immunotherapies.

2. Methods

2.1 Study group

The patients of the present study were from different endemic municipalities of Pernambuco, Brazil. Seventeen patients were selected before treatment (BT), with a

disease evolution around 1.6 months; 11 of them returned 6 months after treatment (PT) and 5 were patients that spontaneously healed (SH). The selection of these individuals was based on criteria such as: being more than 12 years old, having confirmed diagnosis by the CPqAM/FIOCRUZ Leishmaniasis Referee Center, being active lesion carriers when BT patients or having re-epithelized characteristic lesions (scars) when PT and SH patients. The test results of the study group are summarized in Table 1.

Patients selected before treatment were submitted to blood collection prior to chemotherapy treatment with Glucantime[®] (Sanofi-Aventis, Suzano, SP, Brazil). Patients that returned after treatment and that spontaneously healed had their blood collected after cicatrization of their lesions. Ten healthy individuals (CT) represented the control group from non endemic areas and without previous ACL infection. All of them signed the "Term of Free and Informed Consent". The CPqAM/FIOCRUZ Research Ethics Committee, Recife, Brazil approved the experimental protocols.

Table 1. Test results of the study group and patient status (Tabela 3)

Patient	Study Group					
	MST ¹	Direct Microscopy	IFI ²	PCR ³	Number of Amps ⁴	Patients Status
1	10mm	+	+	N/D	1	SH
2	10mm	N/D	-	N/D	0	SH
3	10mm	N/D	-	N/D	0	SH
4	8mm	-	+	+	40	BT,PT
5	10mm	+	+	N/D	100	BT,PT
6	10mm	-	+	N/D	40	BT,PT
7	N/D	-	+	N/D	40	BT
8	8mm	-	N/D	N/D	60	BT,PT
9	8mm	-	+	N/D	20	BT,PT
10	N/D	-	+	+	24	BT,PT
11	10mm	-	+	+	40	BT,PT
12	10mm	-	+	+	100	BT
13	11mm	-	+	N/D	N/I	BT
14	9mm	-	+	N/D	0	SH
15	14mm	-	+	+	40	BT
16	10mm	-	-	N/D	0	BT, SH
17	12mm	-	+	+	80	BT
18	16mm	-	-	+	40	BT,PT
19	14mm	+	-	+	40	BT,PT
20	9mm	+	-	+	40	BT,PT
21	14mm	+	+	+	40	BT, PT

¹MST: Montenegro skin test; ²IFI: Indirect Immunofluorescence; ³PCR: Polymerase chain reaction;

⁴Number of Amps: Number of Ampoules of Glucantime[®] used; +: Positive; -: Negative; N/D: Not done, BT: Before treatment, PT: After treatment, SH: Spontaneously healed

2.2 Leishmania antigenic fractions

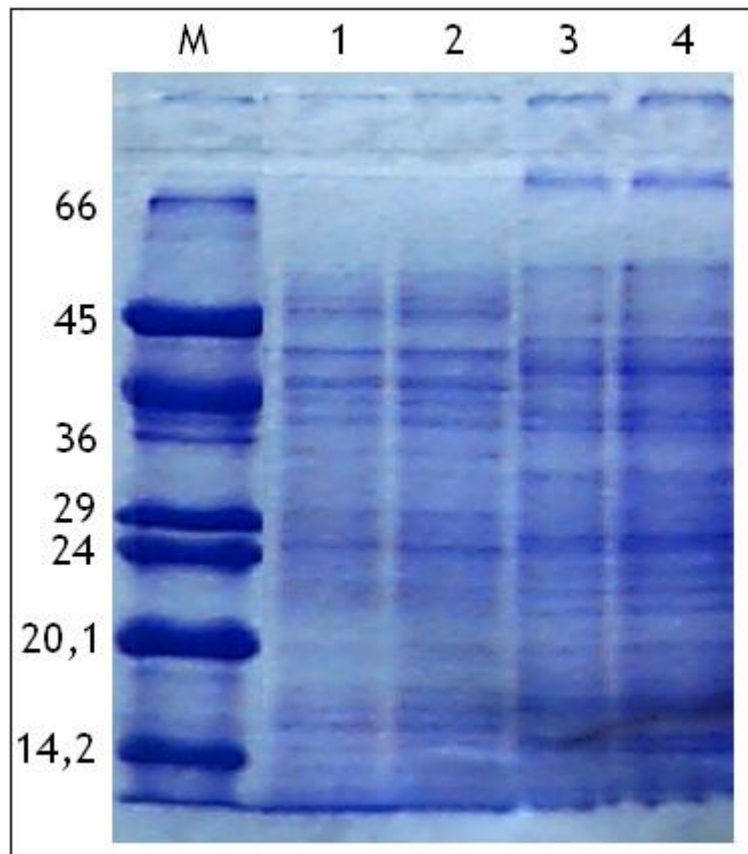
Promastigote forms of *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), cultured *in vitro*, were expanded in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 10% of fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 1% of antibiotics (100 UI/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin; Sigma, St. Louis, MO) until they reached the exponential phase. Afterwards, they were sedimented by centrifugation at 800xg

for 15 min at 4 °C and three times washed with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2). Proteases inhibitors such as 0.1 mM methyl-phenyl-fluoride and 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma, St. Louis, MO), pepstatin A 0.001 M (Sigma, St. Louis, MO), were added right after ultrasonicate (100w/10cycle/30s with 2 pulses/s). The parasitic suspension was centrifuged at 10.000 x g for 10 min at 4°C. The resultant supernatant was removed and submitted to a new centrifugation at 100.000 x g for 1 hr at the same temperature. The resultant supernatant was the soluble antigenic fraction (SOL), while the sediment was the insoluble antigenic fraction (INS). Both were submitted to protein determination according to Brito *et al.* [13]. The antigens were stored at -20 °C until use.

2.3 Electrophoretic profile of soluble and insoluble antigens of *L.(V.) braziliensis*

The protein profile of the soluble and insoluble antigens of *L. (V.) braziliensis* were determined by a SDS (sodium dodecyl sulfate) -polyacrylamide gel electrophoresis. They presented proteins whose molecular weights varied between approximately 66 and 16 kDa compared to the standard molecular weight (Sigma, St. Louis, MO) (Figure 1).

Figure 1: SDS-PAGE of soluble proteins (1 and 2) and insoluble (3 and 4) of *L. (V.) braziliensis*. In wells 1 and 3 were deposited 10 micrograms of antigen, while 15 mg of antigen were placed into wells 2 and 4. M = molecular weight markers in kDa (66 - bovine serum albumin; 45 - ovalbumin; 36 - carbonic anhydrase; 29 - glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; 24 - trypsinogen, 20.1 - trypsin inhibitor and 14.2 - α -lactalbumin). (Figura 14)



2.4 Obtaining the PBMC

Forty milliliters of peripheral blood in heparinized tube were collected, diluted in a proportion of 2:1 in PBS pH 7.2 and then added to a Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) gradient. After centrifugation at 400xg for 30 min at 20°C a peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ring was obtained. The cells were washed twice with PBS pH 7.2 and submitted to centrifugation (300 x g for 15 min at 20°C). PBMCs were resuspended with RPMI 1640 medium (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% of fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 1% antibiotic (100 UI/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin- Sigma, St. Louis, MO) and then counted in a Neubauer chamber using Trypan blue (Sigma, St. Louis, MO). The cells were then adjusted to a concentration of 4×10^6 per tube per ml.

2.5 Cell Culture and Flow Cytometry

PBMCs (4×10^6 per tube/ ml) were incubated with *Leishmania* soluble (SOL, 1.25µg/ml) and insoluble (INS, 2.25µg/ml) antigenic fractions (37 °C/ 5% CO₂), for 48 hours, by means of previous standardization. Brefeldin A (10µg/ml) (Sigma, St. Louis, MO) was added to all tubes 4 hours prior to the end of the incubation period. After the incubation time, ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA, 20 mM) (Sigma, St. Louis, MO) was added to the culture and then incubated for 10 min. The cells were then washed with PBS with 0,5% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO) and 0.1% sodium azide (Sigma, St. Louis, MO), a solution called PBS-W, centrifuged (370xg, 7 min, RT) and transferred to polystyrene tubes. The tubes contained monoclonal antibodies anti-CD4 or anti-CD8, both labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Bioscience, San Jose, CA), and the cells were incubated for 30 min at RT. Afterward the cells were fixed with 1% paraformaldehyde in PBS, washed by centrifugation with PBS-W (400xg, 5 minutes) and permeabilized with PBS plus 0,5% of saponin. Subsequently, the cells were washed with PBS-W by centrifugation (400xg, 5 minutes) and then incubated with cytokine-specific antibodies against IFN- γ , TNF- α , IL-10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and IL-4 (BD Bioscience, San Jose, CA), all labeled with phycoerythrin (PE), for 30 min, RT. After this time, they were washed by centrifugation with PBS-W, (400xg, 5 minutes) and resuspended with 1% paraformaldehyde in PBS. The samples were then analyzed (20.000 events/tube) through flow cytometry (FACSCalibur-BD, San Jose, CA) using the software CELLQuestPro™ (BD Bioscience, San Jose, CA) for acquisition and analysis of data.

2.6 Peripheral blood immunophenotypic analysis

To determine the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, 5ml of peripheral blood were collected in tubes containing EDTA. Subsequently 100µl blood aliquots were transferred to cytometry tubes containing monoclonal antibodies specific for the cell surface markers anti-CD4 or anti-CD8 conjugated with FITC (BD Bioscience, San Jose, CA) and incubated for 30 minutes. Afterwards, the samples were submitted to erythrocytes lysis, followed by 2 washes and centrifugations (7 minutes, 300 x g), with posterior resuspension in 400µl of a 1% paraformaldehyde PBS solution. The

cells immunophenotypic and morphometric parameters were determined by flow cytometry (FACSCalibur-BD, San Jose, CA) using the software CELLQuestPro™ (BD Bioscience, San Jose, CA) for acquisition and analysis of data (50.000 events/tube).

2.7 Analysis

The analyses were done first delimitating the lymphocytic region in a Forward Scatter (FSC) versus Side Scatter (SSC) graph. Based on this region the fluorescence graphs (FL1 x FL2) were constructed, delimitating the quadrants for analyses. The quadrant limits were based on the negative population and previous antibodies titration. The values considered for the fluorescence analysis were the percentage of the quadrant region for each quadrant.

The statistical analyses were performed through SPSS 8.0 and GraphPad Prism 5.1, using nonparametric tests. For intragroup comparative analysis, the Kruskal-Wallis test was used and to detect differences between groups, the Mann-Whitney U-test, based on the two-tailed P value. The results were analyzed considering the value of $P < 0.05$ (statistically significant).

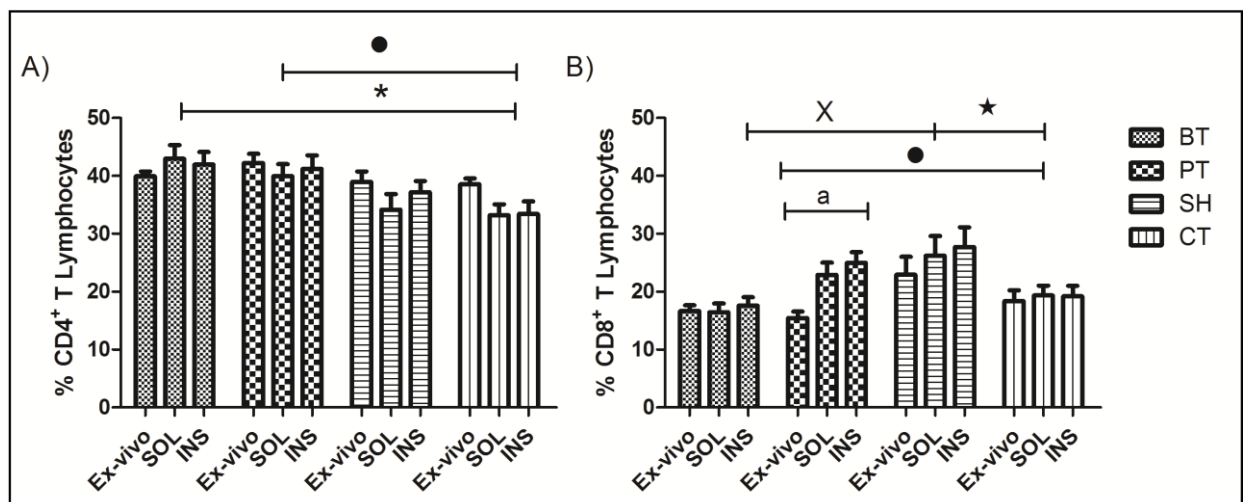
3. Results

3.1 CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes percentage in PBMC cultures after stimulation with *Leishmania* soluble and insoluble antigens: distinct patterns.

In a phenotypic analysis of responding T cells after culture, we could observe that patients cells before and after treatment presented a superior and significant percentage of CD4⁺ T cells when compared to the control group (BTxCT: $p=0.018$ SOL/ $p=0.040$ INS. PTxCT: $p=0.037$ SOL/ $p=0.022$ INS) and also superior when compared to the spontaneously healed group. The percentage of CD4⁺ T cells from patients that spontaneously healed was superior to the one of the control group, but without statistical significance (Fig. 2).

The percentage of the CD8⁺ T cells in cultures, on the other hand, was inferior to controls in patients before treatment, but increased substantially and significantly after treatment (PTxCT: $p=0.033$ SOL/ $p=0.025$ INS). The percentage of CD8⁺ T cells in patients that spontaneously healed was also higher and significantly different when compared to patients before treatment (SHxBT: $p=0.023$ SOL/ $p=0.021$ INS). When the insoluble leishmania antigenic fraction was used the percentage of T CD8⁺ cells from SH were also significantly different when compared to controls (SHxCT: $p=0.028$ INS) (Fig. 2).

Figure 2: CD4⁺ and CD8⁺ T cells percentage comparison in cultures and ex-vivo assays. The differences were considered significant at p less then 0.05 and are represented by the symbols: a= Intragroup difference (ex vivo x SOL x INS); *= difference between BT x CT; • = difference between PT x CT; X= difference between SH x BT; ★= difference between SH x CT. BT= Before Treatment/ PT= After Treatment/ SH Spontaneously Healed/ CT= Controls. (Figura 15)



3.2 T CD4⁺ and T CD8⁺ comparison in ex vivo and culture assays demonstrated a lower CD4/CD8 ratio in PT and SH patients

In order to demonstrate the CD4⁺ and CD8⁺ T cellular profile during an immunological response, we performed a comparison between the percentage of these lymphocytes in the peripheral blood of patients and controls in an ex vivo context and after PBMC culture with the soluble (SOL) and insoluble (INS) antigenic fractions of *L. (V.) braziliensis*.

Patients showed no significant differences when comparing the percentage of CD4⁺ T lymphocytes in the ex vivo assays and in cultures with the antigens. Regarding CD8⁺ T lymphocytes it is interesting to note that SH and PT patients,

presented higher levels of these cells after stimulation with the SOL and INS antigens. This difference was statistically significant when comparing the percentage of CD8⁺ T cells in the *ex vivo* situation with the CD8⁺ T cells after stimulation with the soluble and insoluble antigenic fraction (*ex vivo* x SOL $p=0.006$; *ex vivo* x INS $p=0.001$) (Fig. 2)

Comparing the CD4/CD8 ratio in the *ex vivo* assays and in the PBMC cultures, we found a variation in the values presented by the groups. Patients BT, PT and SH in the *ex vivo* assays, as well BT cultures, showed a CD4/CD8 ratio >2 , while SH patients in the *ex vivo* assays and the PT and SH after antigenic stimulation with the antigenic fractions showed a ratio <2 (Table 2).

Table 2: CD4⁺ T/CD8⁺ T cell ratio *ex vivo* and in cultures stimulated with leishmania soluble and insoluble antigenic fractions (Tabela 4)

<i>CD4⁺/CD8⁺</i> <i>ratio</i>	<i>Ex-</i> <i>vivo</i>	Soluble Antigen	Insoluble Antigen
BT	2.39	2.6	2.38
PT	2.29	1.4	1.65
SH	1.69	1.3	1.12
CT	2.48	1.71	1.74

3.3 Leishmania antigens induced different cytokine profiles, with a predominant Th2 profile in the beginning of infection and a Th1 one after therapy.

The cellular source and frequency of cytokine-producing cells induced by antigenic fractions of *L. (V.) braziliensis*, were determined after culture. When the soluble and insoluble antigenic fractions were used, different profiles were observed. After stimulation with the antigens, CD8⁺ T cells were the main responsible for the production of IFN- γ and TNF- α , the latter only in BT patients. CD4⁺ T cells were mainly producers of IL-10 and IL-4, besides TNF- α in PT and SH patients (Fig. 3 and 4).

The soluble antigen fraction stimulated CD4⁺ T to produce IL-10 (BTxCT $p<0.0001$) and IL-4 (BTxCT $p=0.030$), and CD8⁺ T cells to produce TNF- α , IL-4 and IL-10 (BTxCT $p=0.016$) before treatment. After treatment there was a change in this

profile, with a decreased in the production of IL-4 and IL-10 (BTxPT $p=0.003$) and significant increase in the production of IFN- γ (PTxBT $p=0.023$) and TNF- α (PTxBT $p=0.0002$ / PTxCT $p=0.005$) by CD4⁺ T cells. However, patients still had a significant production of IL-10 (PTxCT $p = 0.005$) by CD4⁺ T cells. CD8⁺ T had a similar profile, with a decrease in IL-4 and IL-10 production (BTxPT $p=0.008$), and a significant increase in TNF- α (PTxBT $p=0.014$) and IFN- γ (PTxBT $p=0.020$) by CD4⁺ T cells. SH Patients showed a higher production of TNF- α , IFN- γ and IL-4 by CD4⁺ T cells and TNF- α and IFN- γ (SHxBT, $p=0.046$) by CD8⁺ T cells. When considering the production of IL-10 by SH group, significant difference was seen in the production of CD4⁺ T cells (BTxSH $p=0.037$ /SHxCT $p=0.019$) (Fig. 3 A and B).

The insoluble antigenic fraction stimulated a significant production of IL-10 (BTxCT $p=0.005$) and IL-4 (BTxCT $p=0.028$) by CD4⁺ T cells before treatment. The CD8⁺ T cells produced a relevant amount of IL-10 ($p=0.004$) when comparing BTxCT. After treatment, an increase in the production of IFN- γ and TNF- α was seen, being the last one significant between patients PTxBT by CD4⁺ ($p= 0.003$) and CD8⁺ ($p= 0.006$) T cells. When considering CD8⁺ T cells the production of IL-10 and IL-4 before and after treatment was similar. Significant difference was seen in the percentage of IL-10 ($p= 0.020$) between the PTxCT by CD4⁺ T cells. The SH group presented a higher production of TNF- α (T CD4⁺, SHxCT $p=0.002$) and a lower production of IL-10 when compared to the one of CD4⁺ ($p=0.008$) and CD8⁺ ($p=0.001$) T cells from BTxSH and with CD8⁺ T cells of PTxSH groups (Fig. 3A and B).

Figure 3: Cytokine expression by (A) CD4⁺ and (B) CD8⁺ T cells after in vitro stimulation with: *Leishmania* soluble antigenic fraction (1.25µg/ml) and *Leishmania* insoluble (2.25µg/ml) antigenic fraction. The results are expressed as mean values $\pm$ SEM. The differences were considered significant at p less then 0.05 and are represented by the symbols: ♦ = difference between PT x BT; ■ = difference between BT x SH; ★ = difference between SH x CT; • = difference between PT x CT; □ = difference between PT x SH; X = difference between SH x BT; * = difference between BT x CT; ○ = difference between BT x PT. BT= Before Treatment/ PT= After Treatment/ SH Spontaneously Healed/ CT= Controls. (Figura 16)

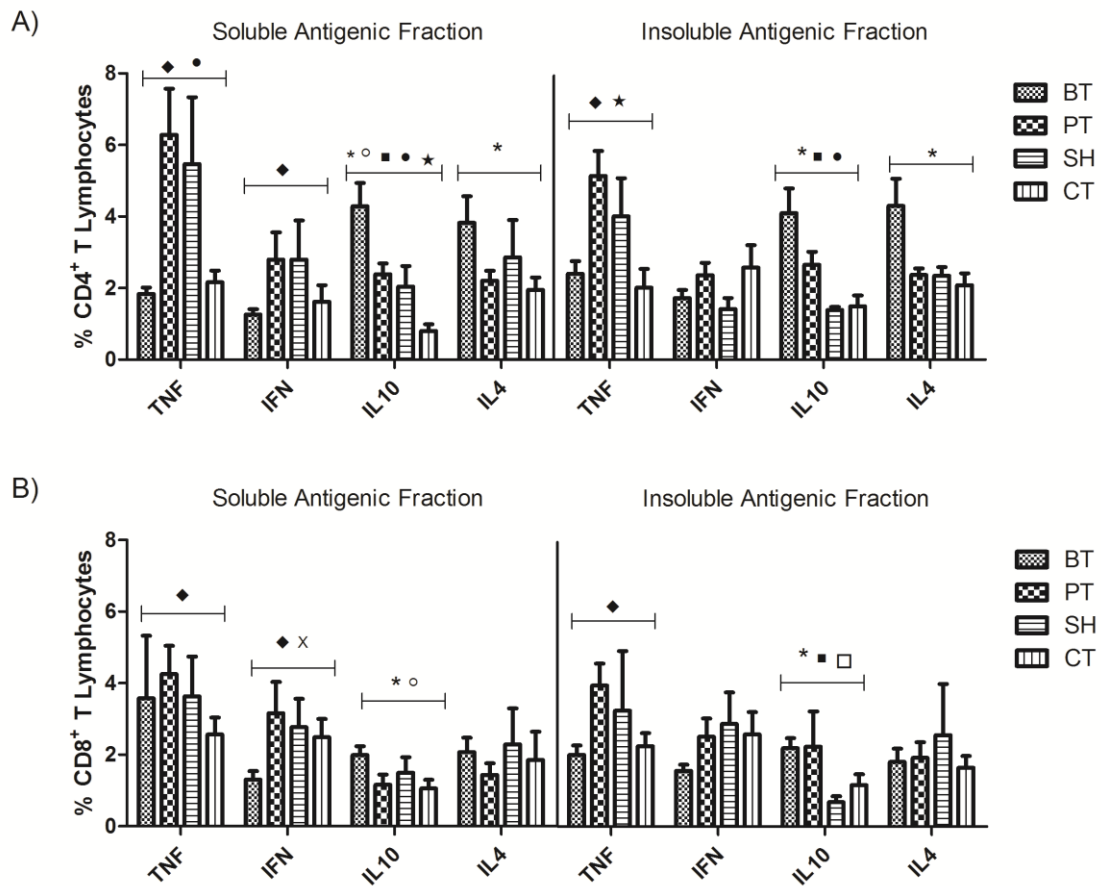
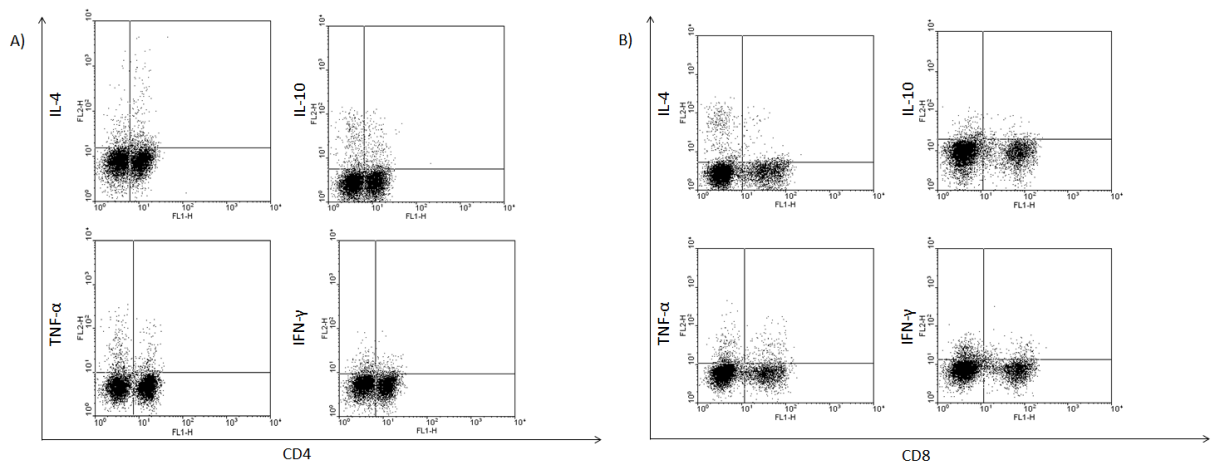


Figure 4- Representative FACS dot plots of cytokine expression by (A) CD4⁺ and (B) CD8⁺ T cells. (Figura 17)



4. Discussion

Human leishmaniasis infection resolution is dependent primarily on the events of T cell subtypes and cytokine production profile [9, 14]. However, the relationship of these mechanisms is still not well-established, especially in human *L. (V.) braziliensis* infections. In the present study we characterized patients before (BT) and after treatment (PT) and those that spontaneously healed (SH) immunophenotypically. *Ex vivo* and culture assays were performed, and we analyzed the cytokines produced in these cultures under *in vitro* stimulation with soluble or insoluble antigenic fractions of *L. (V.) braziliensis*- thereby characterizing and describing the specific immune response profile induced by these fractions.

PBMC cultures revealed a decrease in the CD4⁺/CD8⁺ T cells ratio in patients PT compared to those BT. The SH patients had the lowest CD4⁺/CD8⁺ T cells ratio, with a proportion of CD4⁺ T cells comparable to CT and a proportion of CD8⁺ T cells higher than patients PT and significant when compared with patients BT. CD4⁺ T cells are capable of inducing opposite disease developing profiles, depending on their cytokine production. Our results suggest their involvement in both the pathology and in its cure, as it has been observed by other groups [15, 16]. The CD8⁺ T cells have been involved in the control of ACL infection, and several authors have reported their increase in healed patients, suggesting its role by modulating the activity of CD4⁺ T cells, by direct cytolytic effect of macrophages infected, or even with regulatory effects [9, 15, 17, 18, 19, 20]. Our results confirm that a balance between the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells is important for lesion healing, a hypothesis also reinforced by others [15, 18, 20].

It is important to highlight that the treatment with antimonials promotes a change in the host response to the parasite, either by its direct destruction or by increasing the capacity of the host to combat it. Nevertheless, studies by Da-Cruz et al. [15] demonstrated that the observed changes in the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was a *Leishmania* specific response. In our work, the *ex vivo* study of CD4⁺ and CD8⁺ T cells of patients showed no significant difference, which was seen only after antigen stimulation- what suggests a specific stimulation by our antigen. The values observed *ex vivo* are, however, in agreement with the averages obtained by Autissier et al. [21] and Faria et al. [22], suggesting that deleterious changes were

not induced in patients after chemotherapy, as also implied in the study by Botelho et al. [23].

Studies have shown that antigens from the promastigote forms of *L. (V.) braziliensis*, intact or sonicated, were able to induce different levels of cellular immune response [4, 5, 6, 12, 18, 19, 20, 25, 26, 31] and noted that the search for antigenic molecules is relevant for the identification of new subunit vaccine candidates and targets for immunotherapy. This reinforces the importance of our study seeking to characterize immunologically the soluble and insoluble fractions of *L. (V.) braziliensis*.

This study, comparing the evolution of patients BT, PT and SH observed a significantly production of IL-10 and IL-4 by CD4⁺ T lymphocytes in BT patients. An inversion of this situation, with increased production of IFN- γ and TNF- α , was seen after treatment with Glucantime[®], where IFN- γ was mainly produced by CD8⁺ T cells and TNF- α by CD4⁺ T cells. The SH patients exhibit a predominance of type 1 profile with IFN- γ and TNF- α , however, still with production of Th2 cytokines. The PT patients showed similar results to the ones of SH, suggesting that this is an immunological profile associated with healing. In addition to reinforcing the importance of a type 1 immune response in the evolution for a healing and immunity from the disease, our work also showed that the presence of IL-10, an inhibitory cytokine, is essential as a counterbalance and control of an exacerbated immunopathology, a result also suggested by other groups [11, 19].

In studies with *L. (V.) braziliensis* it was found that in early ACL (<60 days) it is observed a preferential production of IL-10 and that there is a low or absent IFN- γ production. This pattern then evolves into a predominantly Th1 cytokine profile, where patients have IFN- γ production and lymphoproliferation [11, 27, 28]. Our results and those of other groups suggest that susceptible individuals after exposure to the parasite develop a type 2 immune response, allowing parasite survival and growth and the development of lesions. With the progression of the disease, this response changes to type 1 profile, activating macrophages, which leads to the control of parasite growth and disease progression. Therefore, it is possible that the development of the disease depends on a temporary immune dysregulation during the early stages of ACL [1, 5, 11], since works correlate the participation of IL-10 and IL-4 with the evolution of ACL [27, 29, 30].

Most patients with ACL heal after treatment with antimonials, which indicates a later development of an appropriate and beneficial immune response [7, 27, 28]. In the present study we saw that there was a significant increase in production of TNF- α and IFN- γ in PT patients. It is interesting to note that SH patients had the same profile, with the production of TNF- α and IFN- γ , even in the absence of chemotherapy. In endemic *L. (V.) braziliensis* areas spontaneously cured patients have been documented, showing this immune response profile even without treatment [7, 24]. This result reinforces the importance of the type 1 response, and demonstrates that it is necessary to control the multiplication and dissemination of *Leishmania*. Although there is no clinical or laboratory test to predict which patients will respond or fail to treatment with antimonials, it is likely that patients producing high levels of TNF- α and IFN- γ have a better prognosis for cure in infections with *L. (V.) braziliensis*.

However, although a type 1 immune response is critical for the control of leishmaniasis, the loss of an appropriate modulation is responsible for the immunopathology [28]. In our study IL-10 production by CD4⁺ T lymphocytes in PT patients when stimulated with both antigenic fractions and by SH patients when stimulated with the soluble antigenic fraction, was not associated with a low production of IFN- γ and TNF- α . This indicated a coordinated immunoregulation of T cells that produce protective and potentially pathogenic cytokines, a situation that leads to the resolution of the ACL infection. Therefore, as evidenced by our PT and SH patients, a proper balance between the responses that induce a leishmanicidal activity, those that induce the disease, and those that maintain the parasite persistence may be the most desired type of response against infection by *L. (V.) braziliensis*.

The immune pattern observed in the current study appears to be associated with the healing and/or protection in ACL, suggesting the existence of memory T cells and immunoregulatory mechanisms, whose function were triggered by our antigens. Patients' treatment can be beneficiated by immunological interventions if the exact role of T cells subtypes in the disease and resistance can be clarified [7, 12, 17, 29]. The immune response developed by patients against the antigens will be useful in determining an active disease prognosis and the necessary mechanisms for its evolution to cure. The observed result may also be an important parameter for future selection of antigens candidates for vaccine and prognostic tests, since the

development and maintenance of a protective immune profile is very important and there isn't yet a well defined antigen for the quest. This investigation adds informations to the search of factors that contribute to the susceptibility and putative protective immunity against human cutaneous leishmaniasis in *Leishmania (V.) braziliensis* infection and provides additional information on the search for relevant antigens in this disease.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We thank the platform PDTIS/Flow Cytometry (RPT08F) Fiocruz. We are grateful to M.E.F. Brito, L.F. Dugero and C.J. Silva for support with patients. This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq) [472880/2009-8] and by the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) [23038 003155 / 2011-37].

REFERENCES

- 1- R. Reithinger, J.C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander, S. Brooker, Cutaneous Leishmaniasis, *Lancet Infect Dis.* 7 (2007) 581-596.
- 2- WHO. World Health Organization <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> [accessed January 2012].
- 3- M. Ameen, Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics, *Clin Exp Dermatol.* 35 (2010) 699–705.
- 4- P.T.G. Leopoldo, P.R.L. Machado, R.P. Almeida, A. Schriefer, A. Giudice, A.R. Ribeiro de Jesus, J. Ho, L.H. Guimarães, O. Bacellar, E.M. Carvalho, Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production, *BMC Infect Dis.* 6 (2006) 75.
- 5- M.C.A. Brelaz, A.P. Oliveira, A.F. Almeida, M.A. Souza, A.C.R. Medeiros, M.E.F. Brito, V.R.A. Pereira, *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease, *Parasite Immunol.* 34 (4) (2012) 236-9.
- 6- L.R. Castellano, D.C. Filho, L. Argiro, H. Dessen, A. Prata, V. Rodrigues, Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production, *Hum Immunol.* 70(6) (2009) 383-90.
- 7- R.C. Bittar, R.S. Nogueira, R. Vieira-Gonçalves, V. Pinho-Ribeiro, M. S. Mattos, M.P. Oliveira-Neto, S.G. Coutinho, T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102 (5) (2007) 625-30.
- 8- L.R. Antonelli, W.O. Dutra, R.P. Almeida, O. Barcellar, E.M. Carvalho, K. J Gollob, Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis, *Immunol Lett.* 101 (2005) 226-230.

- 9- A.M. Da-Cruz, A.L. Bertho, M.P. Oliveira- Neto, M. P, S.G. Coutinho, S. G., Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions, *Br J Dermatol.* 153(3) (2005) 537-543.
- 10- A. Gomes-Silva, R.C. Bittar, R.S Nogueira, V.S. Amato, M.S. Mattos, M.P. Oliveira-Neto, S.G. Coutinho, A.M. da-Cruz, Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol.* 149 (2007) 440–444.
- 11- A. Baratta-Masini, A. Teixeira-Carvalho, L.C.C. Malaquias, W. Mayrink, A.O. Martins-Filho, R. Corrêa-Oliveira, Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance, *Front Biosci.* 12 (2007) 839-849.
- 12- A.B. Macedo, J.C. Sánchez-Arcila, A.O. Schubach, S.C. Mendonça, A. Marins-Dos-Santos , M. de Fatima Madeira, T. Gagini, M.I. Pimentel, P.M. de Luca, Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis, *Clin Exp Immunol.* 167(3) (2012) 505-13.
- 13- M.E.F. Brito, M.G. Mendonça, Y.M., Gomes, M.L. Jardim, F.G.C Abath, Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis, *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95 (2001) 203-206.
- 14- S.G. Coutinho, A.M. Da-Cruz, A.L. Bertho, M.A. Santiago, P. De-Luca, P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis, *Braz J Med Biol Res.* 31 (1998) 139-142.
- 15- A. M. Da-Cruz, F. Conceição-Silva, A.L. Bertho, S.G. Coutinho, Leishmania-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis, *Infect Immun.* 62(6) (1994) 2614-2618.
- 16- R.L.A. Bottrel, W.O. Dutra, F.A, Martins, B. Gontijo, E. Carvalho, M. Barral-Netto, R.P. Almeida, W. Mayrink, R. Locksley, K.J. Gollob, 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, *Infect Immun.* 69(5) (2001) 3232–3239.
- 17- Y. Belkaid, Regulatory T cells and infections: a dangerous necessity. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 875-888.
- 18- S.G. Coutinho, M.P. Oliveira, A.M. Da-Cruz, P.M. De Luca, S.C. Mendonça, A.L. Bertho, L. Soong, D. McMahon-Pratt, T-Cell Responsiveness of American Cutaneous Leishmaniasis Patients to Purified *Leishmania pifanoi* Amastigote Antigens and *Leishmania braziliensis* Promastigote Antigens: Immunologic Patterns Associated with Cure, *Exp Parasitol.* 84 (1996) 144–155.
- 19- A.M. Da-Cruz, R. Bittar, M. Mattos, M.P. Oliveira-Neto, R. Nogueira, V. Pinho-Ribeiro, R.B. Azeredo-Coutinho, S.G. Coutinho, T-Cell-Mediated Immune Responses in Patients with Cutaneous or Mucosal Leishmaniasis: Long-Term Evaluation after Therapy, *Clin Diagn Lab Immunol.* 9 (2) (2002) 251–256.
- 20- V.P. Toledo, W. Mayrink, K.J. Gollob, M.A. Oliveira, C.A. Costa, O. Genaro, J.A. Pinto, L.C. Afonso, Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment, *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96(1) (2001) 89-98.

- 21- P. Autissier, C. Soulas, T.H. Burdo, K.C. Williams, K., Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans, *Cytometry Part A*. 77(5) (2010) 410-419.
- 22- A.M. Faria, S.M. de Moraes, L.H. de Freitas, E. Speziali, T.F. Soares, S.P. Figueiredo-Neves, S. P., D.M. Vitelli-Avelar, M.A. Martins, M.A., K.V. Barbosa, E.B. Soares, R. Sathler-Avelar, V. Peruhype-Magalhães, G.M. Cardoso, F. Comin, R. Teixeira, S.M. Elói-Santos, D.M. Queiroz, R. Corrêa-Oliveira, M.E. Bauer, A. Teixeira-Carvalho, O.A. Martins-Filho, Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging, *Neuroimmunomodulation*. 15(4-6) (2008) 365-79.
- 23- A.C. Botelho, W. Mayrink, R.C. Oliveira, Alterations in phenotypic profiles of peripheral blood cells from patients with human American cutaneous leishmaniasis following treatment with an antimonial drug and a vaccine, *Acta Trop.* 12(2) (2009) 143-148.
- 24- A. Gomes-Silva, R.C. Bittar, R.S. Nogueira, V.S. Amato, M.S. Mattos, M.P. Oliveira-Neto, S.G. Coutinho, A.M. Da-Cruz, Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol*. 149 (2007) 440-444.
- 25- L.C. Reis, M.E.F. Brito, M.A. Souza, A.C. Medeiros, C.J. Silva, C.F. Luna, V.R.A. Pereira, Cellular Immune Response Profile in Patients With American Tegumentary Leishmaniasis Prior and Post Chemotherapy Treatment, *J Clin Lab Anal*. 23 (2009) 63-69.
- 26- E. Telino, P.M. De Luca, D.C. Matos, R.B. Azeredo-Coutinho, M.N. Meirelles, F. Conceição-Silva, A. Schubach, S.C. Mendonça, *In vitro* responses of human peripheral blood mononuclear cells to whole-cell, particulate and soluble extracts of *Leishmania* promastigotes, *Clin Exp Immunol*. 143 (2005) 338-344.
- 27- A. Salhi, V. Rodrigues Jr., F. Santoro, H. Dessein, A. Romano, L.R. Castellano, M. Sertorio, S. Rafati, C. Chevillard, A. Prata, A. Alcaïs, L. Argiro, A. Dessein, Immunological and Genetic Evidence for a Crucial Role of IL-10 in Cutaneous Lesions in Humans Infected with *Leishmania braziliensis*, *J Immunol*. 180(9) (2008) 6139 - 6148.
- 28- A. Schriefer, M.E. Wilson, E.M. Carvalho, Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis, *Curr Opin Infect Dis*. 21(5) (2008) 483-488.
- 29- S. Ajdary, M.H. Alimohammadian, M.B. Eslami, K. Kemp, A. Kharazmi, Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection, *Infect Immun*. 68(4) (2000) 1760-1764.
- 30- E. Bourreau, C. Ronet, E. Darcissac, M.C. Lise, D. Sainte Marie, E. Clity, F. Tacchini-Cottier, P. Couppe, P. Launois, Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*, *Infect Immun*. 77(4) (2009) 1465-74.
- 31- M.A. Souza, M.C.A.B. Castro, A.P. Oliveira, A.F. Almeida, L.C. Reis, C.J. Silva, M.E.F. Brito, V.R.A. Pereira, American Tegumentary Leishmaniasis: Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Clinical Cure, With or Without Chemotherapy, *Scand. J. Immuno.* 76 (2) (2012) 175-180.

5.2 Artigo 2 (submetido a Human Immunology em 01/2013)

Flow cytometry and quantitative real time PCR as technological approaches in the evaluation of the immune response in active cutaneous leishmaniasis

Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro^{at}, Thays Miranda de Almeida^a, Amanda Ferreira de Almeida^a, Marina de Assis Souza^a, Andresa Pereira de Oliveira^a, Maria Edileuza Felinto de Brito^a, Valéria Rêgo Alves Pereira^a.

a-Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ), Recife, PE, Brasil;

***Corresponding author.** Mailing address: Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Campus da UFPE, 50670-420, Recife, PE, Brazil, CEP. Phone: 55-81-2101-263, Fax: 55-81-21012640. E-mail: carolina.brelaz@gmail.com

Abstract

American Cutaneous leishmaniasis (ACL) is a public health problem, being endemic in many countries and with associated social and economic burdens. The immunological response can influence disease presentation, susceptibility and development, what is dependent on T cell responses and on its cytokine production. Cutaneous leishmaniasis is the most common clinical presentation. The understanding of the role of the host immune response in the control and in the pathology of leishmaniasis through different techniques and with different antigens is highly relevant and has implications on vaccine development, future immunotherapies for the control of the disease. In this study, the differences in the immune response and T cell profile of patients before treatment was investigated through flow cytometry and real time PCR. We described the significant presence of TNF and IFN- γ transcripts at 24h of culture, and of CD4⁺ T cell producing IL-10 and IL-4 48h later, what may be due to the differences in cytokine release over time and the presence of cells other than lymphocytes influencing the mRNA transcript detection. Evaluation of the immune response of individuals with leishmaniasis or other diseases should associate different techniques and times points for a clear a more reliable assessment.

Keywords: American cutaneous leishmaniasis, Immune response, T lymphocytes, Flow cytometry, quantitative real time PCR.

1. Introduction

Leishmaniasis is considered a public health problem, being endemic in many countries and with associated social and economic burdens [1,2,3]. The American cutaneous leishmaniasis (ACL) has a distribution in 88 countries with an estimated of 1.5 million new cases of cutaneous leishmaniasis each year, being a risk for those who travel to Latin America [2,4]. There are more than 20 *Leishmania* protozoa species responsible for disease in humans, transmitted through the bite of an infected sandfly, with *L. (V.) braziliensis* being the main etiological agent in Pernambuco and other Brazilian states [1,3,5].

ACL has a diverse clinical presentation, associated with epidemiological patterns, which may differ according to the phlebotomine sandfly species involved in transmission, population susceptibility and its level of exposure. Host-related factors also influence disease presentation, and in those we can include the immunological status of the host [5-7]. Human infection with *Leishmania braziliensis* can present itself with varied forms of clinical, immunological and histopathological presentations, ranging from asymptomatic forms to cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Cutaneous leishmaniasis is the most common clinical presentation of ACL, characterized as a single or a few ulcers with elevated borders [3,6,8].

Susceptibility or resistance to ACL is dependent on T cell responses. CD4⁺ T cells are capable of inducing opposite disease profiles, dependent on its cytokine production, whereas CD8⁺ T cells are related to the healing process and immunological protection [8-10]. These T cells produce relevant cytokines for activation of macrophage and monocytes, and they undergo a differentiation process before becoming specific T cells. The amount and duration of antigenic stimulation, the type of antigen-presenting cell, the site of immunization and the cytokine milieu all seem to determine the extent and quality of the developed Th response [6]. In human leishmaniasis type 1 immune response, with the production of IFN- γ , TNF and IL-12, has been associated with the infection control [1, 11], while Th2 cytokines, such as IL-4, IL-10 and TGF- β , favor parasite multiplication and disease progression [1,12-14]. These cytokines are also able to inhibit T cell differentiation into a type 1 profile

and the subsequent production of IFN- γ and TNF, acting as a counterbalance to the Th1 proinflammatory effect [8,11,14]. Therefore, the type of the immune response can influence disease susceptibility and development. Even though there are studies that helped to clarify the immune mechanisms of ACL development and pathology, no clear data is available about what immune response is necessary to control the disease and which is the best tool to evaluate this response.

Flow cytometry and RT-PCR have become important tools in the investigation of the immune response. Real time PCR (qPCR) is a highly sensitive technique, allowing quantification of rare transcripts and small changes in gene expression. qPCR is also easy to perform and provides accuracy, rapid and reliable results [15]. Flow cytometry is techniques that can simultaneous detect cytokine production in CD4⁺ and CD8⁺ T cells by intracellular staining, providing means to characterize the individual cytokines expression and some approximation to estimate the immune response mediated by cells in diseases [16,17].

Studies evaluating the immune response in human leishmaniasis have been focused on the immunological mechanisms associated with disease progression and cure. However, only some studies associate different techniques to evaluate the immune response. Since cytokines act in a very complex manner, the analysis of cytokine profiles through different tools is useful to understand the response and activation of the immune system. In this study, the differences in the immune response and profile of patients before treatment was investigated through flow cytometry and real time PCR, together with the capacity of the antigens to elicit it. The understanding of the role of the host immune response in the control of Leishmania infection is highly relevant and has implications on vaccine development and control of leishmaniasis.

2. Materials and Methods

2.1 Study Group

Our study group consisted of 11 patients, from Pernambuco rural areas, with one to four lesions and a disease with a mean development of 50 days (15 days – 3 months). Patients were submitted to blood collection prior to chemotherapy treatment with Glucantime®. The selection of these individuals was based on criteria such as:

being more than 13 years old, having confirmed diagnosis by the CPqAM/Fiocruz Leishmaniasis Referee Center, being active lesion carriers. The control group consisted of 5 healthy individuals, from non endemic areas, and without previous history of ACL. Patients and controls has a similar age range (Controls 28.91 ± 14.27 /patients 27.4 ± 13.28). The study population signed the “Term of Free and Informed Consent” and the The CPqAM/FIOCRUZ Research Ethics Committee, Recife, Brazil approved the experimental protocols. The major characteristics and test results of the study group are summarized in Table 1.

Table 1- Test results and characteristics of the study group (Tabela 5)

Patient	Age (years)	# lesions	MST ¹	Direct Microscopy	IFI ²	PCR ³	Disease development
1	43	1	N/D	-	+	+	2 months
2	26	1	10mm	-	+	+	2 months
3	13	1	10mm	-	+	+	3 months
4	32	1	11.5mm	-	+	N/D	3 months
5	21	1	14mm	-	+	+	1 month
6	27	1	10mm	-	-	+	1 month
7	15	4	12mm	-	+	+	1 month
8	43	2	16mm	-	-	+	15 days
9	23	1	14mm	+	-	+	3 months
10	45	1	9mm	N/D	-	+	1 month
11	44	1	10mm	+	+	N/D	1 month

¹MST: Montenegro skin test; ²IFI: Indirect Immunofluorescence; ³PCR: Polymerase chain reaction; +: Positive; -: Negative; N/D: Not done.

2.2 Leishmania Antigenic Fractions

Promastigote forms of *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), cultured *in vitro*, were expanded in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 10% of fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 1% of antibiotics (100UI/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin; Sigma, St. Louis, MO) until they reached the exponential phase. Afterwards, they were sedimented by centrifugation at 800 x g for 15min at 4°C and three times washed with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2). Proteases inhibitors such as 0.1mM methyl-phenyl-fluoride and 2mM ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma, St. Louis, MO), pepstatin A 0.001M (Sigma,

St. Louis, MO), were added right after ultrasonicate (100w/10cycle/30s with 2pulses/s). The parasitic suspension was centrifuged at 10.000 x g for 10 min at 4°C. The resultant supernatant was removed and submitted to a new centrifugation at 100.000 x g for 1 hr at the same temperature. The resultant supernatant was the soluble antigenic fraction (SOL), while the sediment was the insoluble antigenic fraction (INS). Both were submitted to protein determination according to Brito *et al.* [18]. The antigens were stored at -20°C until use. The electrophoretic profile of soluble and insoluble antigens of *L. (V.) braziliensis* is shown in Brelaz-de-Castro *et al.* [9].

2.3 Obtaining the PBMC

Forty milliliters of peripheral blood in heparinized tube were collected, diluted in a proportion of 2:1 in PBS pH 7.2 and then added to a Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) gradient. After centrifugation at 400 x g for 30 min at 20°C a peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ring was obtained. The cells were washed twice with PBS pH 7.2 and submitted to centrifugation (300 x g for 15 min at 20°C). PBMCs were resuspended with RPMI 1640 medium (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% of fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 1% antibiotic (100 UI/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin- Sigma, St. Louis, MO) and then counted in a Neubauer chamber using Trypan blue (Sigma, St. Louis, MO). The cells were then adjusted to the assay necessary concentration (viability >98%).

2.4 Cell Culture and Flow Cytometry

PBMCs (4×10^6 per tube/ ml) were incubated with *Leishmania* soluble (SOL, 1.25µg/ml) and insoluble (INS, 2.25µg/ml) antigenic fractions (37°C/ 5% CO₂), for 48 hours, by means of previous standardization. Positive controls consisted of cells stimulated 4 hours prior to the end of the incubation period with phytohemagglutinin (PHA, 10µg/ml) Brefeldin A (10µg/ml) (Sigma, St. Louis, MO) was added to all tubes 4 hours prior to the end of the incubation period. After the incubation time, ethylenediamine-tetra-acetic acid (EDTA, 20 mM) (Sigma, St. Louis, MO) was added to the culture and then incubated for 10 minutes. The cells were then washed with PBS with 0,5% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO) and 0.1% sodium azide

(Sigma, St. Louis, MO), a solution called PBS-W, centrifuged (370 x g, 7 min, RT) and transferred to polystyrene tubes. The tubes contained monoclonal antibodies anti-CD4 or anti-CD8, both labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Bioscience, San Jose, CA), and the cells were incubated for 30 min at RT. Afterward the cells were fixed with 1% paraformaldehyde in PBS, washed by centrifugation with PBS-W (400 x g, 5 minutes) and permeabilized with PBS plus 0,5% of saponin. Subsequently, the cells were washed with PBS-W by centrifugation (400 x g, 5 minutes) and then incubated with cytokine-specific antibodies against IFN- γ , TNF, IL-10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and IL-4 (BD Bioscience, San Jose, CA), all labeled with phycoerythrin (PE), for 30 minutes, RT. After this time, they were washed by centrifugation with PBS-W, (400 x g, 5 minutes) and resuspended with 1% paraformaldehyde in PBS. The samples were then analyzed (20.000 events/tube) through flow cytometry (FACSCalibur-BD, San Jose, CA) using the software CELLQuestPro™ (BD Bioscience, San Jose, CA) for acquisition and analysis of data. The analyses were done first delimitating the lymphocytic region in a Forward Scatter (FSC) versus Side Scatter (SSC) graph. Based on this region the fluorescence graphs (FL1 x FL2) were constructed, delimitating the quadrants for analyses. The quadrant limits were based on the negative population and previous antibodies titration. The values considered for the fluorescence analysis were the percentage of the quadrant region for each quadrant.

2.5 Cell culture, RNA isolation and cDNA synthesis

PBMCs (10^6 per well/ ml) were incubated with *Leishmania* soluble (SOL, 1.25 μ g/ml) and insoluble (INS, 2.25 μ g/ml) antigenic fractions for 24 hours (37°C/ 5% CO₂) in a 24 well plate (TPP Trasadingen, Switzerland). Total RNA was isolated from PBMC using Trizol solution (Life Technologies Carlsbad, CA), according to the manufacture's recommendations. RNA purity was verified by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. OD_{260/280} determination (above 1.8) and RNA quantification was done using a NanoDrop™ Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) and the RNA was kept at -80°C until ready to use.

RNA samples from patients and controls were adjusted to 100ng/ul, and the Reverse Transcription PCR reaction (RT) was carried out with the "TaqMan® Reverse

Transcription Reagents” kit (Applied Biosystems, Foster City, CA. Catalog #N8080234). RT-PCR was performed in a final volume of 50µl, containing TaqMan RT Buffer 1x, MgCl₂ 5.5mM, dNTPs mix 500µM, randomic hexamers 2.5µM, RNase inhibitor 0.4 U/µL, *multiscribe reverse transcriptase* enzyme 3.125 U/µL and 12.375µL of the sample. The cycling conditions were as follows: 10 minutes at 25°C, 30 minutes at 48 °C and 5 minutes at 95 °C. Negative controls were included in each run. After this stage, samples were stored at -20 °C until its utilization in the real time PCR assays (qPCR).

2.6 Relative quantitative Real-Time PCR

To quantify the mRNA expression of the cytokines TNF (Assay ID:00174128_m1), IFN-γ (Assay ID: Hs99999041_m1), IL-10 (Assay ID: Hs00174086_m1) and IL-4 (Assay ID:99999030_m1) in the samples, the real time TaqMan® PCR was used. A housekeeping gene 18S was simultaneously processed in Real-time TaqMan® PCR for each sample, as an endogenous control. This was done to normalize the process due to the variability in the number of cells in the original samples, for differences in extraction efficiency, for mRNA degradation in the starting material, and for reverse transcriptase reaction efficiency. qPCR was carried out using 1µl of cDNA as the starting material in a total volume of 20 µl with TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) . All reactions were performed in the Model ABI PRISM 7500 Sequence Detector (PE Applied Biosystems). The relative quantification was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. In this method, the fold change in the sample gene, given by delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), is determined by the following equation: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{sample}) - \Delta Ct (\text{calibrator})$ and ΔCt is the CT of the target gene (sample or calibrator) subtracted from the Ct of the housekeeping gene, 18S. Using this method, a positive fold change would represent up-regulation of the sample gene compared to the calibrator; whereas a negative fold change would represent down-regulation of the sample gene compared to the calibrator.

2.7 Statistical Analysis

The statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.1 (GraphPad Prism 5.1 Software, San Diego, CA, USA), using nonparametric tests. To detect

differences between groups the Mann–Whitney U-test was used significant (based on the two-tailed P value). The results were analyzed considering the value of $P \leq 0.05$ statistically.

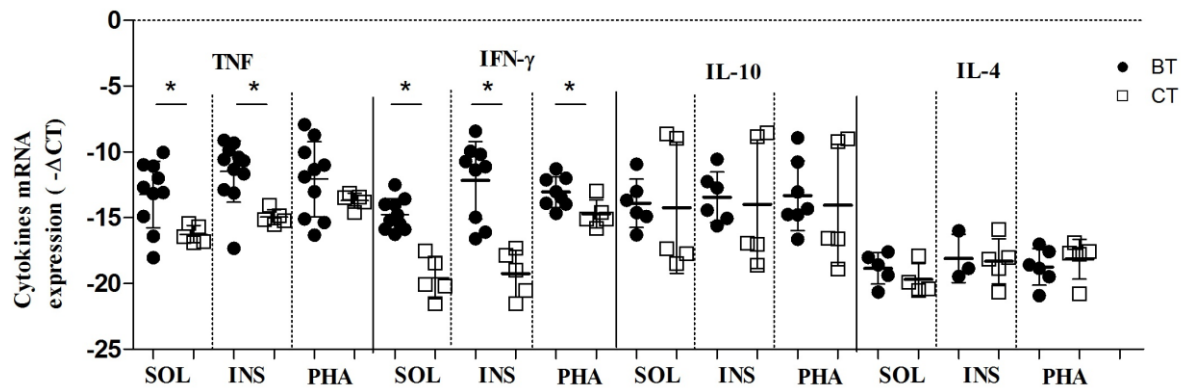
3. Results

3.1 qPCR revealed IFN- γ and TNF significant production 24h after PBMC culture

Aiming to demonstrate the cytokine profile (IFN- γ , TNF, IL-4 and IL-10) during an initial immunological response, we performed a comparison between patients and controls cytokine mRNA expression 24h after PBMC culture with the soluble (SOL) and insoluble (INS) antigenic fractions of *L (V.) braziliensis*, and with the mitogen PHA, as shown in figure 1.

Under PHA stimulus, all the groups expressed mRNA for the cytokines, with significant difference observed in the production of IFN- γ by patients ($\Delta CT = 13.06 \pm 1.15$) when compared to controls ($\Delta CT = 14.72 \pm 1.070$) ($P = 0.045$). The soluble antigenic fraction stimulated patients and controls cells to produce cytokines, with statically significance observed in the production of IFN- γ (Patients $\Delta CT = 14.76 \pm 1.20$; Controls $\Delta CT = 19.56 \pm 1.58$; $P < 0.001$) and TNF (Patients $\Delta CT = 13.25 \pm 2.53$; Controls $\Delta CT = 16.26 \pm 0.650$; $P = 0.028$). The insoluble antigenic fraction also stimulated patients and controls cells to produce cytokines, and it was observed a significant production of IFN- γ (Patients $\Delta CT = 12.17 \pm 2.94$; Controls $\Delta CT = 19.24 \pm 1.77$; $P = 0.001$) and TNF (Patients $\Delta CT = 11.49 \pm 2.33$; Controls $\Delta CT = 14.96 \pm 0.562$, $P = 0.013$).

Figure 1: Patients and controls cytokines mRNA expression 24h after PBMC culture with the mitogen PHA or with the soluble (SOL) and insoluble (INS) antigenic fractions of *L. (V.) braziliensis*, following normalization with the reference gene (18S). The results are expressed as mean values $\pm$ SD. Differences between groups were considered significant with a P value less than 0.05 and are represented by the symbol “*” (difference between patients and controls). BT= Before Treatment/ CT= Controls (Figura 18).



3.2 Patients with active lesions presented a higher proportion of CD4+ T cells producing IL-4 and IL-10 48h after antigenic stimulation.

T lymphocytes source and their percentage of cytokines (IFN- γ , TNF, IL-4 and IL-10) produced was determined 48h after PBMC culture with the soluble (SOL) and insoluble (INS) antigenic fractions of *L. (V.) braziliensis*, and with the mitogen PHA, as shown in figure 2. Total lymphocyte production was evaluated in order to compare to the qPCR, since in this technique is not possible to determine the cellular source of cytokines.

Under PHA stimulus, all the groups produced cytokines, with significant difference observed in the production of TNF by lymphocytes (CTxBT $p=0,005$) and also specifically by CD8⁺ T cells (CTxBT $p=0,022$). After stimulation with the *Leishmania* antigens CD8⁺ T cells were the main responsible for the production of IFN- γ and CD4⁺ T cells were the main producers of IL-10, IL-4 and TNF. Overall, the soluble antigen fraction stimulated IL-10 significant production by lymphocytes (BTxCT $p=0,041$), and specifically CD4⁺ T cells to produce IL-10 (BTxCT $p=0,0007$) and IL-4 (BTxCT $p=0,003$), and CD8⁺ T cells to produce TNF (CTxBT $p=0,019$), IL-4 (BTxCT $p=0,028$) in a significant manner when compared to controls. The insoluble antigenic fraction stimulated a significant production of IL-10 (BTxCT $p=0,004$) and

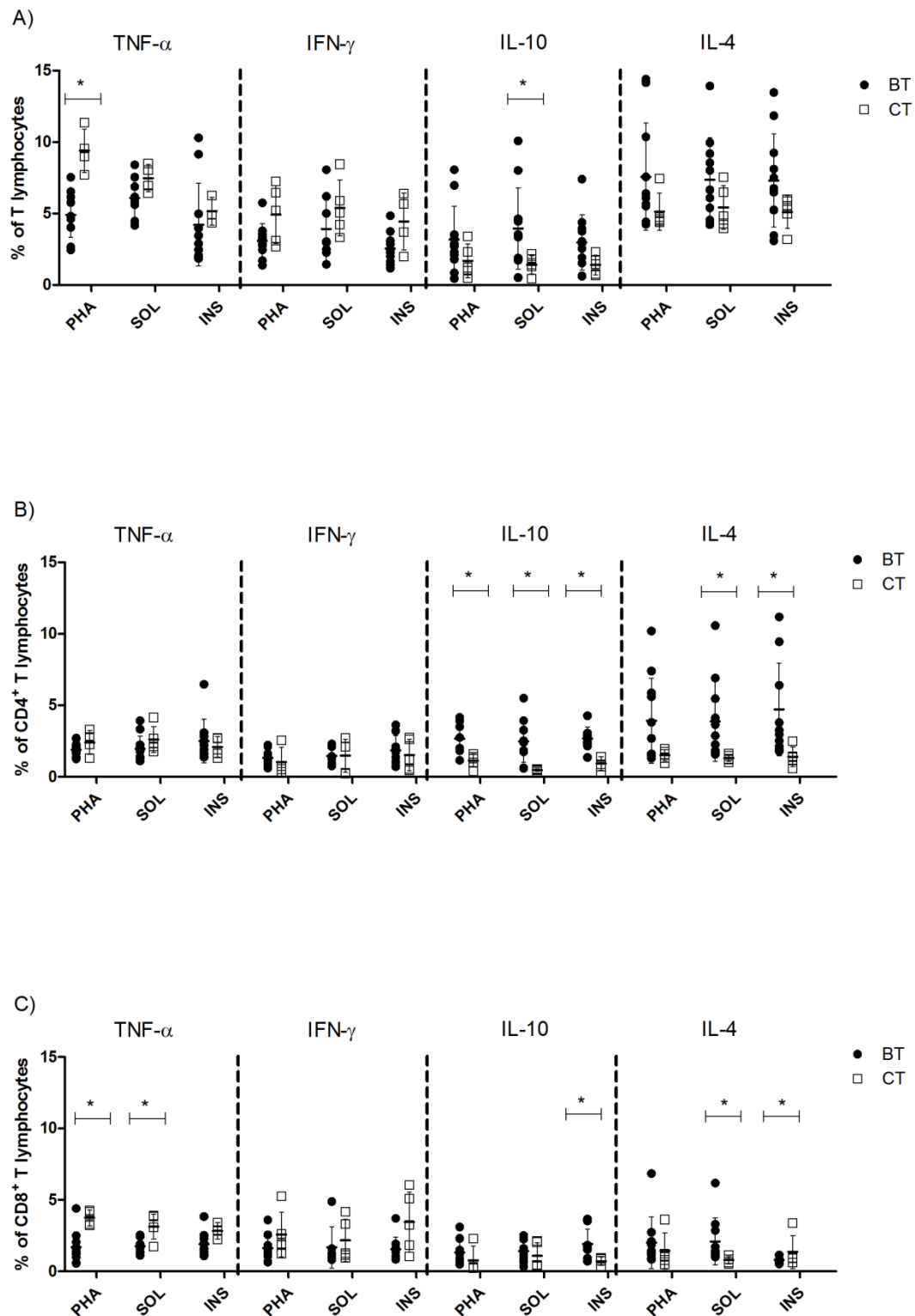
IL-4 (BTxCT $p=0,006$) by patients $CD4^+$ T cells and IL-10 (BTxCT $p=0,033$) and IL-4 (BTxCT $p=0,043$) by patients $CD8^+$ T, when comparing to controls.

The inflammatory versus regulatory cytokine balance was evaluated through the IFN- γ /IL-10 ratio between patients and controls. Patients presented a lower IFN- γ /IL-10 ratio when compared to controls (table 2). $CD4^+$ / $CD8^+$ ratio was also evaluated between patients and controls, with patients presenting $CD4^+$ predominance when compared to controls (table 2).

Table 2: $CD4^+$ / $CD8^+$ T cell ratio and IFN- γ^+ /IL-10 $^+$ ratio in cultures stimulated 48h with Leishmania soluble and insoluble antigenic fractions. (Tabela 6)

	Soluble Antigen	Insoluble Antigen
<i>BT $CD4^+$/$CD8^+$ ratio</i>	2.71	2.51
<i>CT $CD4^+$/$CD8^+$ ratio</i>	1.49	1.5
<i>BT $CD4^+$ IFN-γ/IL-10 ratio</i>	0.78	0.71
<i>BT $CD8^+$ IFN-γ/IL-10 ratio</i>	2.35	0.95
<i>CT $CD4^+$ IFN-γ/IL-10 ratio</i>	3.52	1.95
<i>CT $CD8^+$ IFN-γ/IL-10 ratio</i>	2.08	4.83

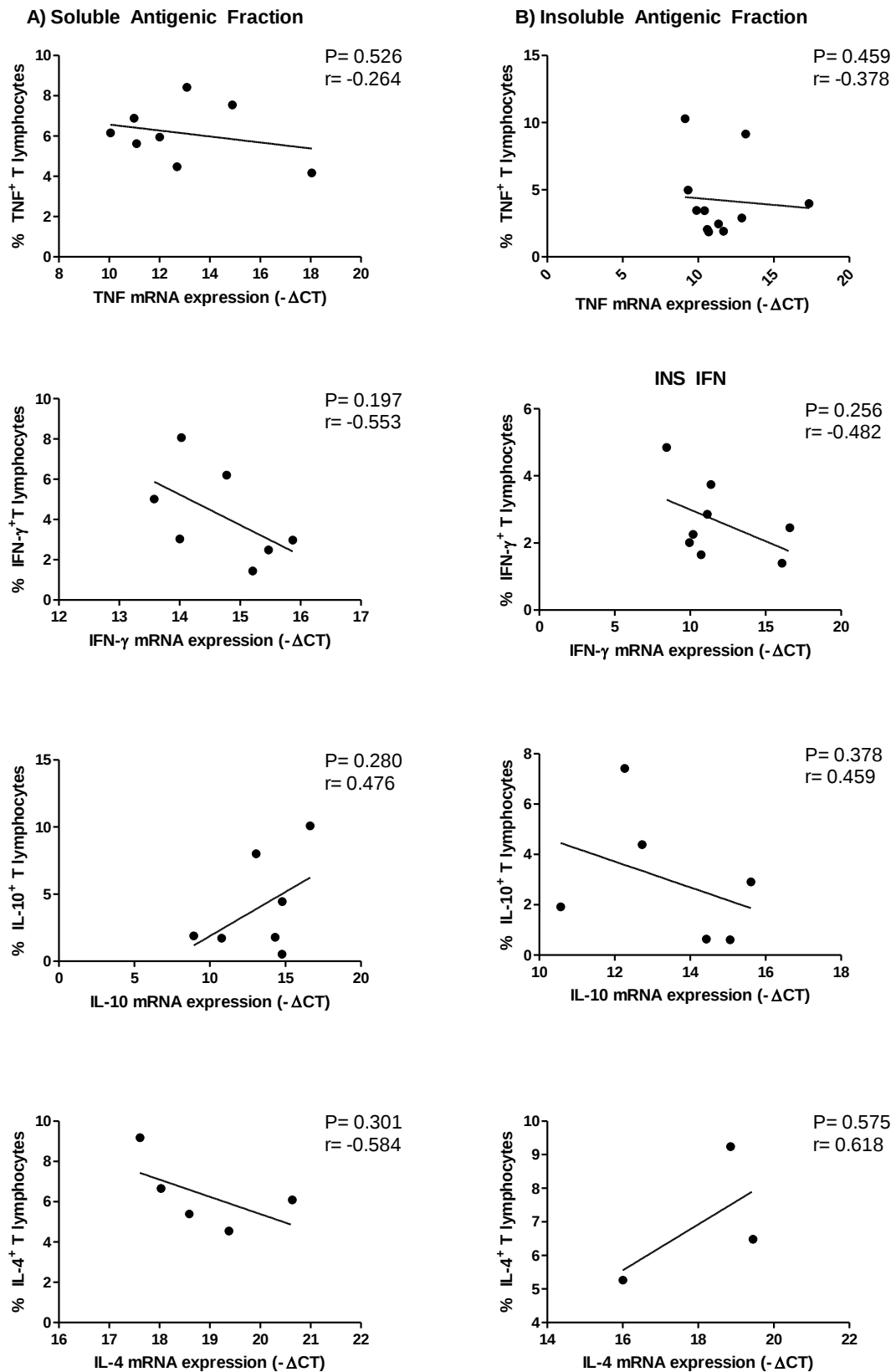
Figure 2: Cytokine expression by A) T cells, B) CD4⁺ T cells and C) CD8⁺ T after in vitro stimulation with PHA, Leishmania soluble (SOL) and insoluble (INS) antigenic fractions. The results are expressed as mean values $\pm$ SD. Differences between groups were considered significant with a P value less then 0.05 and are represented by the symbol “*” (difference between patients and controls). BT= Before Treatment/ CT= Controls. (Figura 19)



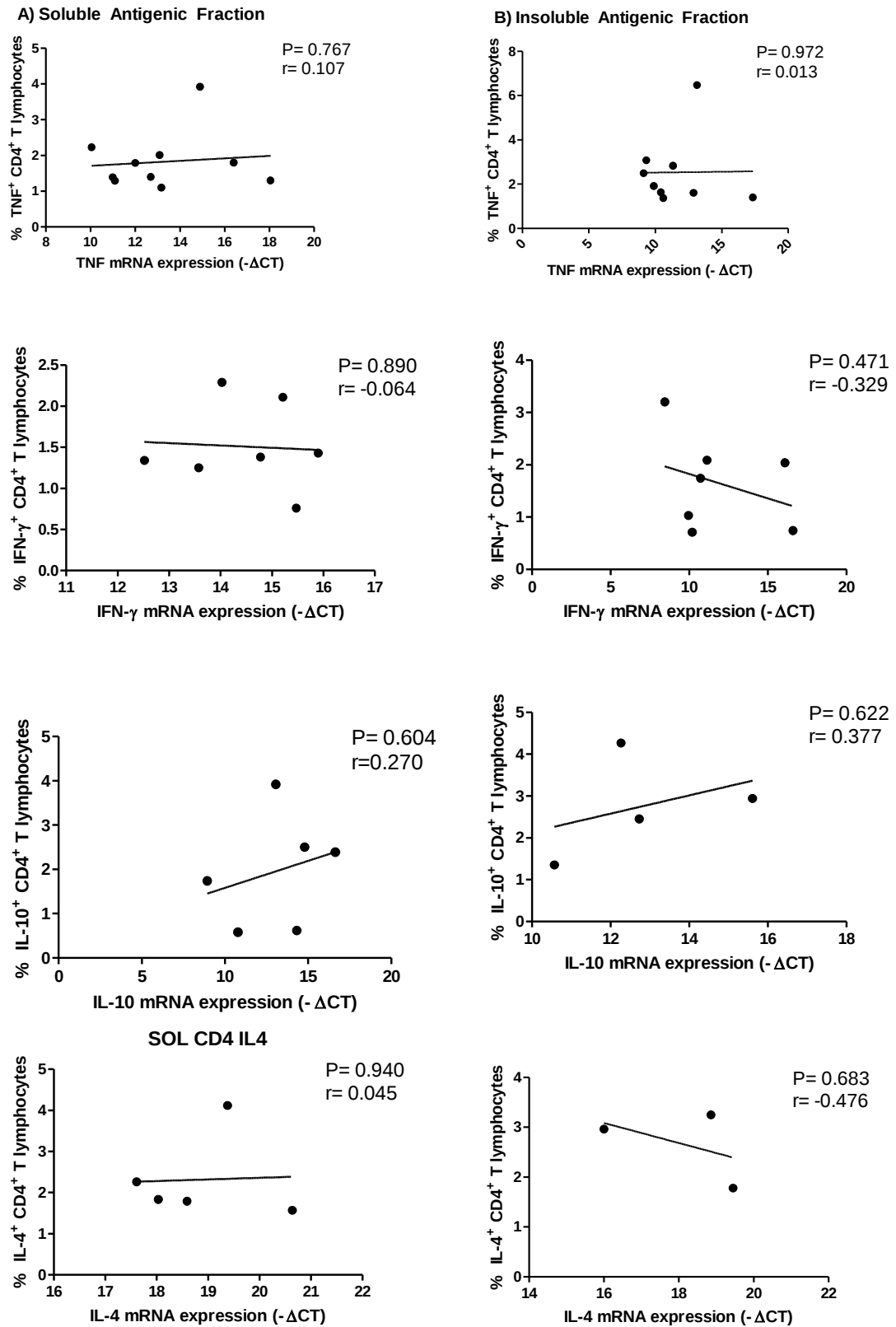
3.3 Flow cytometry and qPCR analysis did not demonstrate significant correlation

The correlations of the gene expression (mRNA) and the percentage of cytokines produced by T CD4⁺ and CD8⁺ cells were studied for all samples. The data shows distinct patterns over the time course, with the point of cytokine release and the duration and the magnitude of the cytokine detectable in Figure 1 and 2. qPCR showed the significant production of IFN- γ and TNF at 24h, and flow cytometric analysis the significant percentage of IL-10 and IL-4 produced by T cells at 48h. However no significant correlation between the cytokines production at 24h by qPCR and at 48h by flow cytometry evaluation was observed (Supplementary data).

Supplementary figure 1: Correlations of the gene expression (mRNA) and the percentage of cytokines produced by T cells after *in vitro* stimulation with Leishmania (A) soluble (SOL) (B) and insoluble (INS) antigenic fractions

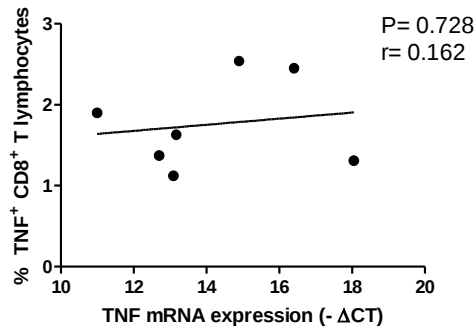


Supplementary figure 2: Correlations of the gene expression (mRNA) and the percentage of cytokines produced by CD4⁺ T cells after *in vitro* stimulation with Leishmania (A) soluble (SOL) (B) and insoluble (INS) antigenic fractions

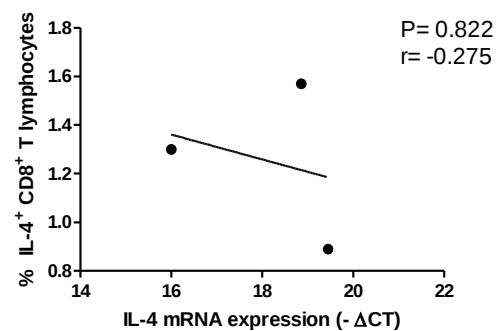
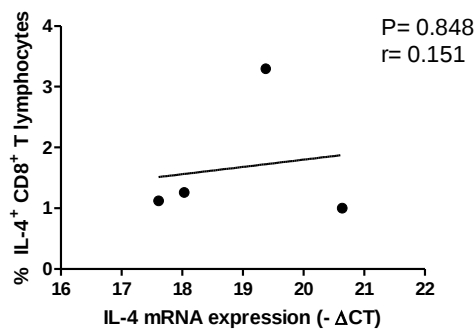
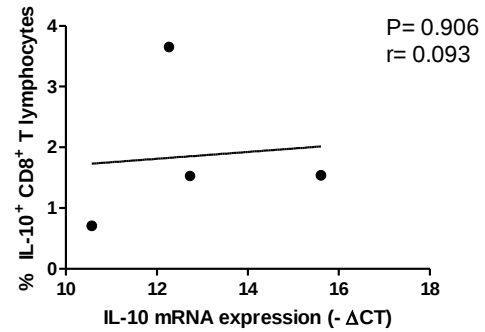
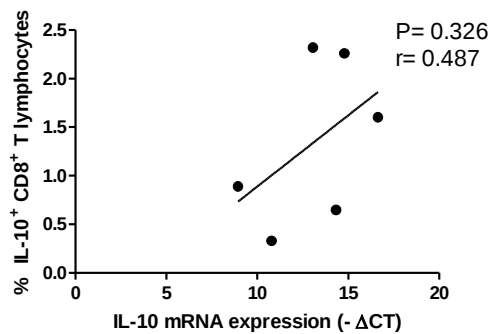
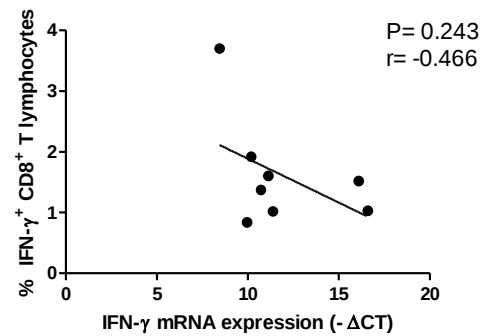
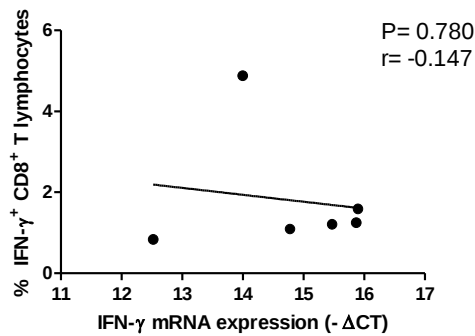
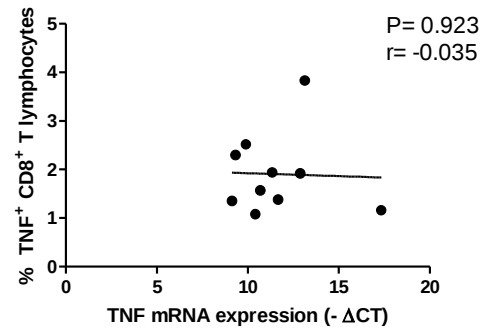


Supplementary figure 3: Correlations of the gene expression (mRNA) and the percentage of cytokines produced by CD8⁺ T cells after *in vitro* stimulation with *Leishmania* (A) soluble (SOL) (B) and insoluble (INS) antigenic fractions

A) Soluble Antigenic Fraction



B) Insoluble Antigenic Fraction



4. Discussion

Leishmaniasis is a disease where the development of lesions and their resolution are closely linked to the development of an appropriate immunological response. T cells have a major role in this response, where CD8⁺ and CD4⁺ T cells are better studied and characterized, this last with the classic Th1 and Th2 profiles of cytokines well described. These T cells act through direct cytotoxicity (CD8⁺ T cells) and/or produce several cytokines and chemokines. Cytokines can react in cascades with other cytokines and lead to a higher or lower production or secretion of further cytokines, consequently acting in a very complex manner. Therefore the analysis of cytokine profiles is useful to understand the response and activation of the immune system. In this study we described the *in vitro* production of cytokines after PBMC culture with the soluble and insoluble antigenic fractions of *L (V.) braziliensis*, and with the mitogen PHA. They were analyzed through qPCR and Flow Cytometry, the last one also describing the population that produced it.

qPCR is a common method to detect cytokine transcripts in cells; however few studies analyzed their production in human leishmaniasis [19]. In our study we observed mRNA expression of the cytokines IFN- γ , TNF, IL-4 and IL-10, being IFN- γ significant expressed by patients when compared to healthy controls under all stimulation and TNF, under soluble and insoluble stimulus. Works with animal models revealed that reactive oxygen species produced by IFN- γ activated mononuclear phagocytes is the main mechanism for leishmania destruction by macrophages [3, 21]. High amounts of IFN- γ and TNF can be seen in both, *Leishmania* antigen-stimulated PBMC cultures, and in the ulcer of ACL patients [3, 22]. Nonetheless, since not all transcripts become protein, it's important to assess cytokine quantity through flow cytometry.

Flow cytometry analysis demonstrated the presence of the cytokines IFN- γ , TNF, IL-4 and IL-10, being IL-10 and IL-4 significant expressed by patients T CD4⁺ and CD8⁺ cells when compared to healthy controls under different circumstances of stimulation. CD4⁺ T cells were the main responsible for IL-4 and IL-10 production. When considering the CD4⁺/CD8⁺ ratio, we observed an expansion of CD4⁺ T cells when compared to controls. This may account for the increased proportion of IL-10 and IL-4 observed, since CD4⁺ T cells were their main producers. Previous studies by our groups also demonstrated similar results, and it was shown that this type 2

response later evolved to a Th1 profile after patients' clinical cure, however still with the presence of IL-10 [7,9].

The development and maintenance of a protective immune response seems to be associated with a Type 1 cytokine predominant profile, however with an appropriated modulation. When considering the IFN- γ ⁺/IL-10⁺ ratio among patients and controls PBMCs stimulated with the soluble and insoluble *L. (V.) braziliensis* antigens, it was observed that patients presented a higher proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells producing IL-10, while the controls presented higher proportion of T CD4⁺ and CD8⁺ T cells producing IFN- γ . As seen in other studies, CD4⁺ and CD8⁺ T cells proportion and cytokine balance is important for lesion progression or healing [9,23,24].

Although the Th1 immune response seems to be beneficial, the control of an exacerbated immune response is essential for cure. The production of IL-10, initially related mainly to parasite survival and macrophage deactivation, seems to represent a necessary counterbalance for disease resolution [25]. IFN- γ and TNF production is also not associated with the absence of IL-10 [3]. IL-10 is the cytokine that is most strongly associated with lesions development, and is mainly released by monocytes and CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes [26-28]. Therefore the balance between a pathological and protective immune response seems to be given by regulatory T cells [26]. Cells with regulatory functions have been frequently described in *Leishmania* infections, and the existence of concomitant immunity is discussed [29,30]. Nevertheless, conclusive role of Treg cells in suppression of immunity in patients and on the mechanisms involved in the disease development is yet to be defined.

Trying to understand the immune response mechanisms in the control and in the pathology of Leishmaniasis, we correlated the production of cytokines through qPCR and flow cytometry; however no significant association was found. Stimulated cytokine secretion is usually a process of hours or days, controlled by autocrine and paracrine regulation and feedback loops, with secretion activity dropping down to normal without continuous stimulation. Lymphocytes have no reservoirs for cytokines; therefore, the initial activation of transcription and biosynthesis in lymphocytes is strongly related to the consecutive secretion [31].

Leishmania active infections has been related to type 1 and 2 cytokine profiles, depending on the antigen used, the time of disease evolution and the technique reported [8,14,12,32,33]. Previous works by our group, measuring cytokines through ELISA from cells stimulates with the *L. (V.) braziliensis* soluble antigen in patients

with longer disease evolution time, reported the presence of significant Th1 cytokines [3] however still with the significant presence of IL-10 [35] also seen in other studies with *L. (V.) braziliensis* antigens [8,12,14,36]. Additional studies with the same antigens used in this report but with patients with shorter evolution time and analyzed through flow cytometry, demonstrated $T\ CD4^{+}$ and type 2 cytokines predominance profile [8,10] that have been also described by other groups [8,26,28,37]. Therefore, this Th1/Th2 profile seems to be an oversimplification of what is happening inside the host and it seems that regulation of the inflammatory response rather than biased Th1/Th2 response defines the outcomes of infection with *Leishmania Viannia* species [20,22,35]. Other T cell subsets have important roles in susceptibility and resistance to leishmaniasis, such as Treg and Th17 cells. Th17 and Treg cells can develop from naïve $CD4^{+}$ T, and an imbalance between these two cell types may lead to tissue inflammation. All this emphasizes the need to study T cell response regarding its magnitude, quality and through different techniques.

Given that the qPCR mRNA examination at 24 h only reflects a snapshot, it can be assumed that if low gene expression values and high cytokine levels are detected for a distinct data pair, this may reflect that the gene expression had already declined due to an effectual level of cytokines reached in the cell culture supernatant at an earlier point. Also since this is a technique that identifies the presence of cytokines transcripts, but not the cells containing the transcripts, we may be analyzing transcripts from cells other than lymphocytes, such as monocyte, that largely contribute to IFN- γ and TNF secretion and type 1 or 2 cytokine differentiation, what must be considered in a deep analysis [3,38]. Therefore, the different cytokines profiles observed in our patients when using flow cytometry and qPCR may be due to the differences in cytokine release over time and the presence of cells other than lymphocytes influencing the mRNA transcript detection.

In this study, we described the significant presence of TNF and IFN- γ transcripts at 24h of infection, and of $CD4^{+}$ T producing IL-10 and IL-4 48h later, after the soluble and insoluble antigen of *L. (V.) braziliensis* were used for PBMC stimulation to evaluate a more specific immune response. The understanding of the role of the host immune response in the control and in the pathology of leishmaniasis through different techniques and with different antigens is highly relevant and has implications on vaccine development, future immunotherapies and therefore in the control of leishmaniasis. Therefore, as seen by our results, studies aiming to evaluate the

immune response of individuals with leishmaniasis or other diseases should associate different techniques and time points, such as flow cytometry and qPCR - to obtain a clear a more reliable evaluation.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We thank the platform PDTIS/Flow Cytometry (RPT08F)- FIOCRUZ. We are grateful to L. F. da Rocha for technical assistance (FACEPE-FIOCRUZ). This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq) [472880/2009-8] and by the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) [23038 003155 / 2011-37].

5. References

- [1] Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol* 2010; 35: 699–705.
- [2] WHO. World Health Organization <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> [accessed December 2012].
- [3] Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol* 2012; 3:301
- [4] Schwartz E, Hatz C, Blum J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:342–9
- [5] de Brito ME, Andrade MS, Dantas-Torres F, Rodrigues EH, Cavalcanti Mde P, de Almeida AM et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45(4):425-9.
- [6] Macedo AB, Sánchez-Arcila JC, Schubach AO, Mendonça SC, Marins-Dos-Santos A, de Fatima Madeira M, et al. Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 2012; 167(3):505-13.
- [7] Brelaz MC, de Oliveira AP, de Almeida AF, de Assis Souza M, Medeiros ÂC, de Brito ME et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. *Parasite Immunol*, 2012; 34(4):236-9.
- [8] Baratta-Masini A, Teixeira-Carvalho A, Malaquias LCC, Mayrink W, Martins-Filho AO, Corrêa-Oliveira R. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Front Biosci* 2007; 12: 839-49.
- [9] Brelaz-de-Castro MC, de Almeida AF, de Oliveira AP, de Assis-Souza M, da Rocha LF, Pereira VR. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol* 2012; 279(2):180-6

- [10] Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V et al. T-Cell-Mediated Immune Responses in Patients with Cutaneous or Mucosal Leishmaniasis: Long-Term Evaluation after Therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9 (2): 251–256.
- [11] Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous Leishmaniasis, *Lancet Infect Dis* 2007; 7:581-596.
- [12] Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol* 2009; 70(6):383-90.
- [13] Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(5):625-30.
- [14] Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* 2007; 149(3):440-4.
- [15] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9):e45.
- [16] Kemp K, Theander TG, Hviid L, Garfar A, Kharazmi A, Kemp M. Interferon- γ and Tumour Necrosis Factor- α -Producing Cells in Humans who are Immune to Cutaneous Leishmaniasis. *Scand. J. Immunol* 1999; 49: 655–659.
- [17] Godoy-Ramirez K, Franck K, Mahdaviifar S, Andersson L, Gaines H. Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2004; 292(1-2):1-15.
- [18] Brito MEF, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 203-206.
- [19] Ettinger NA, Wilson ME. Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2(6):e252
- [20] Díaz YR, Rojas R, Valderrama L, Saravia NG. T-bet, GATA-3, and Foxp3 expression and Th1/Th2 cytokine production in the clinical outcome of human infection with *Leishmania* (*Viannia*) species. *J Infect Dis* 2010; 202(3):406-15
- [21] Horta MF, Mendes BP, Roma EH, Noronha FSM, Macêdo JP, Oliveira LS et al. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. *J Parasitol Res.* 2012, 2012: 203818, 11 pages, doi:10.1155/2012/203818
- [22] Nylén S, Gautam S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2010; 2(2):135-46
- [23] Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M 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. *Infect Immun* 2001; 69(5): 3232–3239.

- [24] Toledo VP, Mayrink W, Gollob KJ, Oliveira MA, Costa CA, Genaro O, et al. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(1):89-98.
- [25] Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 2005; 101: 226-30.
- [26] Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, et al. Immunological and Genetic Evidence for a Crucial Role of IL-10 in Cutaneous Lesions in Humans Infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* 2008; 180(9): 6139 - 6148.
- [27] Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 2006; 193(9):1313-22.
- [28] Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E et al. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun* 2009; 77(4):1465-74.
- [29] Belkaid, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(11): 875-88.
- [30] Falcão CS, de Moura TR, Clarencio J, Brodskyn C, Barral A, de Oliveira CI. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. *Int. J. Parasitol* 2012, 42(8): 771–80.
- [31] Radke L, López Hemmerling DA, Lubitz A, Giese C, Frohme M. Induced cytokine response of human PMBC-cultures: correlation of gene expression and secretion profiling and the effect of cryopreservation. *Cell Immunol* 2012; 272(2):144-53.
- [32] Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun*, 2000; 68(4): 1760-64.
- [33] Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schrieffer A, Giudice A, de Jesus AR et al. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis* 2006; 6:75.
- [34]- Souza MA, Castro MC, Oliveira AP, Almeida AF, Reis LC, Silva CJ et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Clinical Cure, With or Without Chemotherapy. *Scand J Immunol* 2012; 76 (2): 175–180.
- [35] Reis LC, Brito ME, Souza MA, Medeiros AC, Silva CJ, Luna CF et al. Cellular Immune Response Profile in Patients With American Tegumentary Leishmaniasis Prior and Post Chemotherapy Treatment. *J Clin Lab Anal* 2009; 23: 63–69.
- [36] Telino E, De Luca PM, Matos DC, Azeredo-Coutinho RB, Meirelles MN, Conceição-Silva F et al. *In vitro* responses of human peripheral blood mononuclear cells to whole-cell, particulate and soluble extracts of *Leishmania* promastigotes. *Clin Exp Immunol* 2005; 143: 338–44.
- [37] Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 1999; 180(5):1731-4.

[38] Sachdeva N, Asthana D. Cytokine quantitation: technologies and applications. *Front Biosci* 2007; 12:4682-95.

5.3 Artigo 3 (Manuscrito em fase de redação)

Avaliação das respostas Th1, Th2, Th17 e das células T regulatórias em pacientes com leishmaniose cutânea antes da cura clínica.

Pequeno título: Imunomodulação na LTA ativa

Resumo

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença que merece maior atenção devido à sua magnitude, alta morbidade e possibilidade de causa deformidades estigmatizantes. O perfil de citocinas e a contribuição individual de populações de linfócitos T são determinantes para o entendimento da resposta imune protetora e patológica na infecção por leishmania. Nesse estudo investigamos o perfil dos linfócitos Treg *ex vivo*, e dos linfócitos Th1, Th2 e Th17 após cultura de PBMC com mitógeno e a produção de citocinas em pacientes com LTA ativa. Vimos que os pacientes apresentaram um perfil Th2 e Th17, indicando a existência de uma imunomodulação no início da infecção e a aparente associação do perfil Th17 com mecanismos patogênicos. As células Treg estavam presentes com diferentes subpopulações, onde as aTreg expressaram significativamente os marcadores CCR4 e CTLA-4, e as rTreg CCR7, condizentes com as suas funções. Correlações positivas e negativas entre os perfis foram encontradas, sendo a dos perfis TregxTh1 significativa. Nosso estudo mostrou que a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro na LTA é dinâmica, e poderá contribuir em futuros estudos para desenho apropriado de intervenções imunológicas em pacientes.

1. Introdução

A leishmaniose é considerada um problema de saúde pública, com um aumento de incidência observada nos últimos anos (Goto; Lindoso, 2010; Reithinger *et al.*, 2007). Estima-se que a Leishmaniose tegumentar americana tenha uma prevalência de 10 milhões de casos, com 1-1,5 milhões de ocorrências anuais (OMS, 2010). Esta é uma doença que merece maior atenção devido à sua magnitude, alta morbidade e possibilidade de causa deformidades estigmatizantes (Choi; Kropf, 2009; Clem, 2010,).

A LTA apresenta manifestações clínicas diversas, associadas com padrões epidemiológicos e a susceptibilidade da população. A infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* pode apresentar variadas formas clínicas (desde formas assintomáticas até formas cutâneas e mucocutâneas) e diferentes formas histopatológicas. Fatores relacionados aos indivíduos influenciam na apresentação da doença, e a resposta imunológica desempenha um importante papel na cura clínica da doença ou na sua progressão (Brito *et al.*, 2012; Brelaz *et al.*, 2012).

Na leishmaniose humana a imunidade é predominantemente mediada por linfócitos T (Souza *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2010). Os linfócitos T desempenham seu papel na 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; Sharma; Singh, 2009). Nesse contexto, estudos imunofenotípicos têm sido associados com os eventos de resistência e susceptibilidade a LTA (Bottrel *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2011; Brelaz *et al.*, 2012).

Na leishmaniose humana, o padrão de resposta imune do tipo 1 com produção de IFN- γ , TNF e IL-12, tem sido associado com o controle da infecção por ativação macrofágica e destruição parasitária (Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012; Roberts, 2006). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β , consideradas do tipo 2, favorecem a multiplicação parasitária, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ , além de inibir a diferenciação dos linfócitos Th1 (Gomes-Silva *et al.*, 2007; Baratta-Masini *et al.*, 2007).

Embora a resposta Th1 seja importante para o controle da infecção, já foi demonstrada a necessidade de um contrabalanço com as células produtoras de citocinas do tipo Th2, pois esses mecanismos são importantes para manter a integridade tecidual do hospedeiro contra uma subsequente resposta inflamatória (Baratta-Masini *et al.*, 2007; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012). Além disso, a dicotomia Th1/Th2 como indicador de resistência e susceptibilidade é um modelo simplificado diante da diversidade de mecanismos imunes e citocinas relacionadas à resposta imunológica na LTA. Outros subtipos de células T CD4⁺, como células T regulatórias (Treg) e células Th17 também parecem apresentar papel importante na susceptibilidade e resistência a LTA (Kedzierski, 2010; Nylén; Gautam, 2010). O perfil Th17 está envolvido no aumento da produção de múltiplos mediadores inflamatórios (como IL-1, TNF, NOS2 e quimiocinas) que estão relacionados às respostas imunes inatas e adaptativas, permitindo a eliminação do patógeno invasor

(Souza *et al.*, 2013, Eastaff-Leung *et al.*, 2010). Já as Treg regulam a resposta imunológica, parecendo controlar o tênue balanço estabelecido entre o patógeno e o hospedeiro. O balanço entre as células Treg e Th17 pode ser essencial para a manutenção do equilíbrio imunológico (Belkaid *et al.*, 2007; Deknuydt *et al.*, 2009; Eastaff-Leung *et al.*, 2010).

Dessa maneira, o perfil de citocinas e a contribuição individual de populações celulares são determinantes para o entendimento da resposta imune protetora e patológica na infecção por leishmania (Bottrel *et al.*, 2001, Brelaz-De-Castro *et al.*, 2012). No presente estudo, as respostas das células Treg, Th1, Th2 e Th17 foram investigadas

2. Materiais e Métodos

2.1 Grupo de estudo.

Nosso grupo de estudo foi composto por pacientes antes do tratamento para avaliação das citocinas em soro e oito para os ensaios de citometria de fluxo. Todos foram provenientes das áreas rurais de Pernambuco, com uma a sete lesões e um desenvolvimento de lesão variando de 15 dias a 3 meses. Os pacientes foram submetidos à coleta de sangue antes do tratamento com Glucantime[®]. A seleção desses pacientes foi baseada em critérios como: Idade superior a 13 anos, apresentação de confirmação diagnóstica, e portadores de lesões ativas. O grupo controle consistiu de quatorze indivíduos saudáveis para os ensaios de avaliação de citocinas em soro e dez para os ensaios de citometria de fluxo. Todos eram de áreas não endêmicas, e sem história prévia de LTA. As populações de estudo assinaram o “Termo de consentimento livre e esclarecido” e o Comitê de Pesquisa e ética CPqAM/FIOCRUZ, Recife, Brasil, aprovou os protocolos experimentais.

2.2 Anticorpos utilizados

Os seguintes anticorpos monoclonais, contra os marcadores de superfície leucocitária humana foram utilizados: CD4-isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD8-FITC, CD4-ficoeritina/cianina 7 (PECy7), CD3-PECy7, CCR7-aloficocianina (APC) adquiridos da Ebioscience (San Diego, CA); CD45RA-FITC, CD25-APC,

comprados da BD Pharmigen (San Jose, CA); CLA-PE, adquiridos da Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) e CCR4-APC, comprado da R&D Systems (Minneapolis, MN). Os seguintes anticorpos monoclonais contra marcadores/citocinas intracelulares também foram utilizados: IL-10-PE, IL17-PE, IL-21-PE, IL-23-PE, IFN- γ -PECy7, IL-4-PECy7, IL-17-APC, IL-22-APC, todos da Ebioscience (San Diego, CA); FOXP3-PE, CTLA-4-APC, FOXP3-Alexa Fluor® 647 (AF647), adquiridos da BD Pharmigen (San Jose, CA), e TNF-PE adquiridos da Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany).

2.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Quarenta mililitros (40ml) de sangue foram coletados utilizando-se o sistema a vácuo. O sangue foi diluído em PBS pH 7,2 na proporção 2:1 e transferido para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia), também na proporção 2:1. Após centrifugação, a 400 x g por 30 minutos a 20°C, foi obtida uma camada de PBMC. As células foram lavadas duas vezes com 20 ml de PBS pH 7.2 e submetidas a nova centrifugação a 300xg por 15 minutos a 20°C. Depois do descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). Uma alíquota da suspensão celular foi então removida, diluída em azul de trypan (Sigma, St. Louis, MO) e quantificada em câmara de Neubauer, sendo feito o ajuste celular para o ensaio.

2.4 Marcação *ex vivo* de linfócitos Treg

Para determinação das populações de células Treg *ex vivo*, PBMC (10^6 células por tubo) foram suspensas e PBS-W e marcadas com os anticorpos de superfície anti- CD4, CD25, CD45RA, CLA, CCR4, CCR5, CCR7 por 30 minutos a TA. Em seguida as células foram processadas baseadas protocolo do “Human FoxP3 Buffer Set” da BD Pharmigen (San Diego, CA). Após a incubação, as células foram lavadas com 2 ml de PBS-W por centrifugação (400xg, 5 minutos, TA), ressuspensionadas com 1 ml do Buffer A e incubadas por 10 minutos, seguida de centrifugação (400xg, 5 minutos, TA) e nova lavagem por centrifugação com PBS-W (400xg, 5 minutos, TA). Logo após foi feita a adição aos tubos de 250uL do

tampão C, com incubação de 30 minutos (TA, ao abrigo da luz) e seguido por duas lavagens por centrifugação com PBS-W (400xg, 5 minutos, TA). Por fim, as células foram marcadas com os anticorpos intracelulares anti- FOXP3, IL-10 e CTLA-4, incubadas por 30 minutos (TA, ao abrigo da luz), lavadas por centrifugação e ressuspensas em PBS-W. As amostras foram analisadas (>20 mil eventos/tubo) em citômetro de fluxo (FACSCalibur- BD Bioscience) usando o software “Cell Quest Pro” (BD Bioscience) para aquisição e para análise o software FlowJo 7.6.5 (®Tree Star Inc.) As análises foram realizadas inicialmente delimitando-se a região linfocitária no gráfico de Dispersão Frontal (FSC) versus Dispersão lateral (SSC). A partir dessa região os gráficos de fluorescência para FOXP3 e CD4 foram delimitados, selecionando-se a população duplamente positiva. Essa população foi segregada de acordo com o seu nível de expressão dos marcadores CD45RA e FOXP3 em: $CD4^+FOXP3^{LO}CD45RA^+$ (células em repouso ou rTreg), $CD4^+FOXP3^{hi}CD45RA^-$ (células Treg ativadas ou aTreg), e $CD4^+FOXP3^{LO}CD45RA^-$ (nãoTreg). Esses subtipos de células Treg foram então analisados quanto à expressão dos marcadores CLA, CCR4, CCR5, CCR7, CTLA-4 e IL-10. Os limites dos quadrantes foram sempre baseados na população negativa e titulações prévias dos anticorpos. Os valores considerados para análise da fluorescência foram os do percentual da região linfocitária para cada quadrante e/ou histograma.

2.5 Cultura celular e citometria de Fluxo

PBMC (5×10^5 por tubo/ml) de 8 pacientes e 10 controles foram marcadas com anti-CD4 (30 min, TA, -FITC), e então cultivadas por 6 horas na presença de PMA (50ng/mL)/ionomicina (500 ng/mL) (todos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), segunda prévia padronização. Brefeldina A (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi adicionada por 4 horas antes do término da cultura para assegurar a retenção da citocina no interior celular. Após a incubação, adicionou-se diretamente às culturas ácido etilenodiaminotetraético (EDTA, 20 mM, Sigma, St. Louis, MO) com incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram então lavadas em solução salina contendo 0,5% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 0,1% de azida sódica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), uma solução denominada de PBS-W, centrifugadas (370 x g, 7 minutos) e transferidas para tubos

de poliestireno. Nos tubos estavam os anticorpos monoclonais de superfície anti-CD3, e -CD8, e as células foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente. Passado esse período as células foram fixadas com solução salina contendo 1% de paraformaldeído por 10 minutos, lavadas por centrifugação (370 x g, 7 minutos) com PBS-W e permeabilizadas com PBS-W mais 0,5% de saponina. Logo em seguida, foram lavadas com PBS-W por centrifugação (400 x g, 5 minutos), e então incubadas com os anticorpos monoclonais anti-IFN- γ , anti-TNF, anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL17, anti-IL21, anti-IL22 e anti-IL23. Após incubação, as células foram lavadas com PBS-W por centrifugação (400 x g, 5 minutos), e resuspendidas em PBS-W. As amostras foram analisadas (>20 mil eventos/tubo) em citômetro de fluxo (FACSCalibur- BD Bioscience) usando o software "Cell Quest Pro" (BD Bioscience) para aquisição e para análise o software FlowJo 7.6.5 (©Tree Star Inc.). As análises foram realizadas inicialmente delimitando-se a região linfocitária no gráfico de FSC versus SSC. A partir dessa região os gráficos de fluorescência para CD4 foram delimitados, escolhendo-se as células positivas. Esses linfócitos foram então avaliados quanto a sua produção de citocinas. Os limites dos quadrantes foram sempre baseados na população negativa e titulações prévias dos anticorpos. Os valores considerados para análise da fluorescência foram os do percentual da região linfocitária para cada quadrante e/ou histograma.

2.6 Avaliação da concentração de citocinas no soro de pacientes com LTA

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A foram mensuradas em soro de 30 pacientes antes do tratamento e 14 controles. Foi utilizado o kit CBA humano Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, Catálogo #560484, BD Bioscience, San Jose, CA) e segundo recomendações do fabricante. Os limites de detecção das citocinas, segundo o fabricante, são: IL-2- 2,6 pg/ml; IL-4- 4,9 pg/ml; IL-6- 2,4 pg/ml; IL-10- 4,5 pg/ml; TNF- 3,8 pg/ml; IFN- γ - 3,7 pg/ml; IL-17A- 18.9 pg/ml. A aquisição dos dados foi feita através do citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) e as análises através do software FCAP Array v1.0 (Soft Flow Inc).

2.7 Análise estatística

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

3. Resultados

3.1 Perfil Th1xTh2.

O percentual de linfócitos T $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ foi investigado. Essas células T e a razão $CD4/CD8$ estão descritas na tabela 1. Nenhuma diferença significativa foi observada.

Pacientes com lesões ativas e controles foram avaliados quanto a seu tipo linfocitário e as citocinas produzidas ($IFN-\gamma$, TNF, IL-4 e IL-10) após 6h de cultura de suas PBMCs com os mitógenos PMA/ionomicina, como mostrado na figura 1.

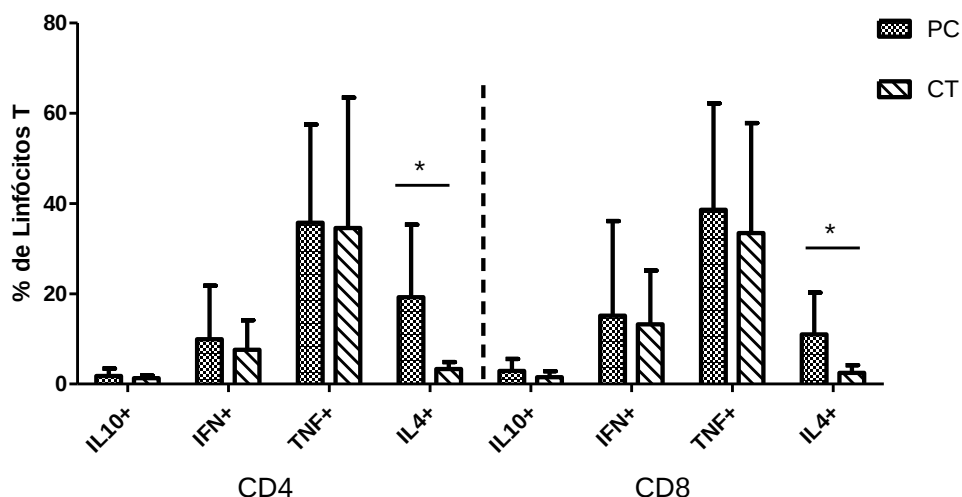
Todos os grupos apresentaram produção de citocinas, com diferença significativa sendo observada apenas na produção de IL-4 ($p=0,0005$), e na produção simultânea de IL-10 e $IFN-\gamma$ ($p=0,0266$) por linfócitos T $CD4^+$. Linfócitos T $CD8^+$ produziram de maneira significativa IL-4 ($p=0,0021$) e simultaneamente IL-10 e $IFN-\gamma$ ($p=0,0266$), além de TNF e IL-4 ($p=0,0117$).

Tabela 1: percentual de linfócitos T e razão $CD4/CD8$ em culturas estimuladas por 6 h com PMA/ionomicina. Pacientes (n=8)/ Controles (n=10) (Tabela 7).

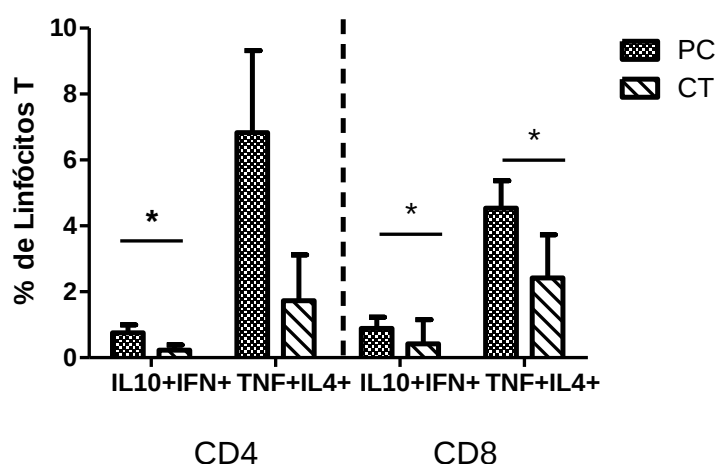
Linfócitos	Pacientes	Controles
$CD3^+$	68,79 ($\pm 8,9$)	76,33 ($\pm 2,68$)
$CD4^+$	37,26 ($\pm 9,7$)	40,35 ($\pm 7,75$)
$CD8^+$	21,79 ($\pm 8,2$)	26,96 ($\pm 7,97$)
Razão $CD4^+/CD8^+$	2,28 ($\pm 1,26$)	1,68 ($\pm 0,73$)

Figura 1: Percentual de expressão de citocinas tipo 1 e 2 por linfócitos T após estimulação in vitro com PMA (50ng/ml)/ionomicina(50ng/ml). A) Percentual de expressão de uma única citocina por células T CD4+ e CD8+; B) Percentual de expressão simultânea de citocinas por células T CD4+ e CD8+. Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SD. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo “*” (diferença entre pacientes e controles). PC= Pacientes (n=8)/ CT= Controles (n=10) (Figura 20).

A)



B)

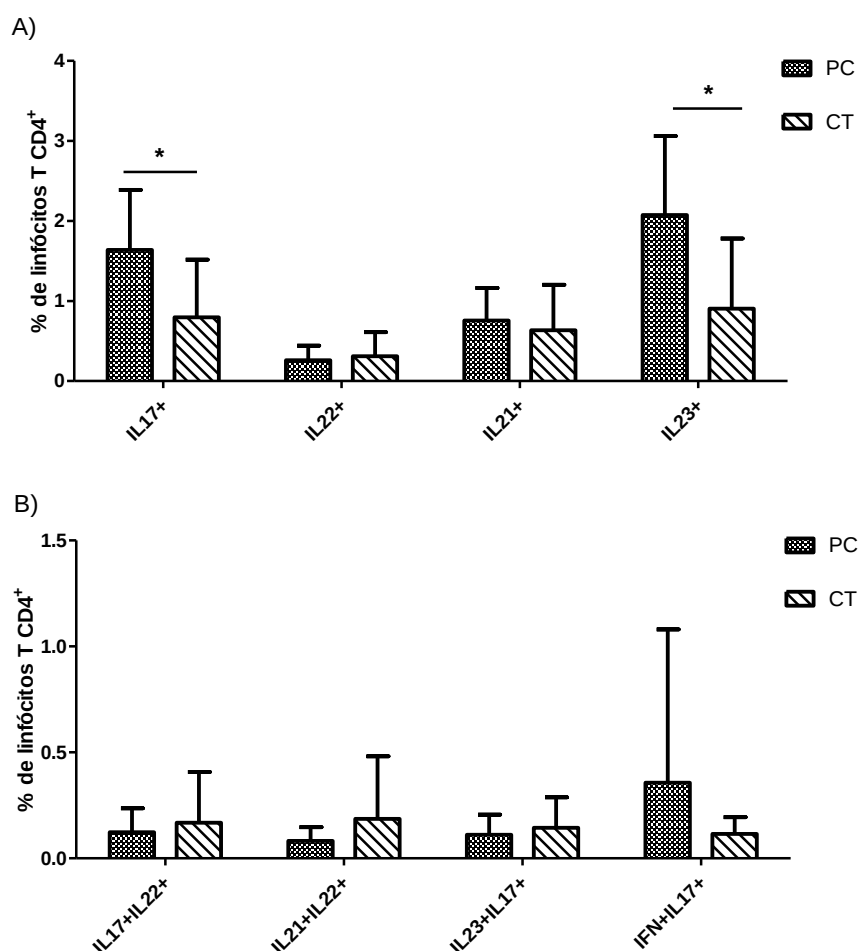


3.2 Perfil Th17

Pacientes com lesões ativas e controles foram avaliados em relação ao percentual de citocinas Th17 produzidas (IL-17, IL-21, IL-22, IL-23) após seis horas de cultura com os mitógenos PMA/ionomicina, como mostrado na figura 2. Todos os

grupos produziram as citocinas, com diferenças significativas sendo observadas na produção de IL-17 ($p=0,043$) e IL-23 ($p=0,0155$) entre pacientes controles. Não foi observada diferença na produção de citocinas simultaneamente pelas células T CD4⁺ (Figura 2).

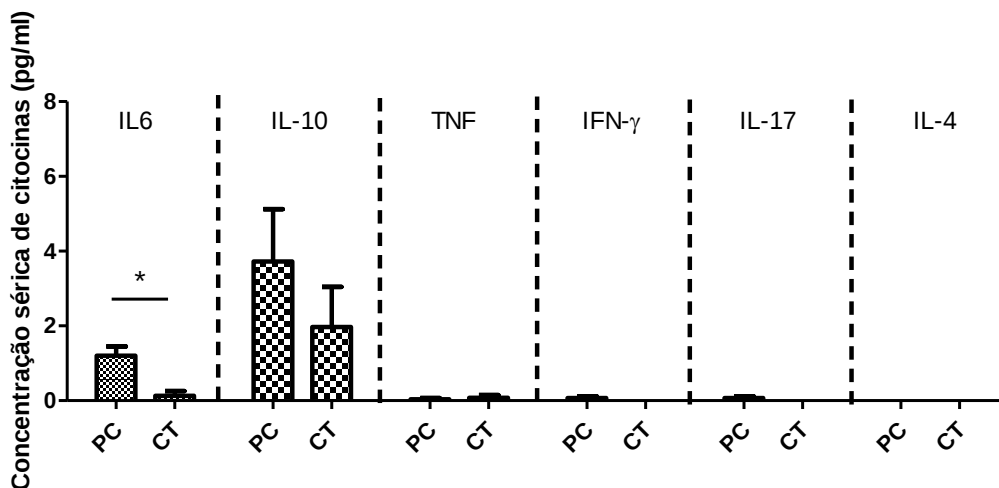
Figura 2: Percentual de expressão de citocinas Th17 por linfócitos CD4⁺ T após estimulação in vitro com PMA (50ng/ml)/ionomicina (50ng/ml). A) Percentual de expressão de uma única citocina por células T CD4⁺; B) Percentual de expressão simultânea de citocinas por células T CD4⁺. Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SD. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo “*” (diferença entre pacientes e controles). PC= Pacientes (n=8)/ CT= Controles (n=10) (Figura 21).



3.3 Detecção de citocinas no soro

A análise de pacientes com lesões ativas e controles demonstrou a presença de algumas citocinas no soro (figura 3). Foi observada diferença significativa da citocina IL-6 entre pacientes e controles ($p= 0,008$).

Figura 3: Citocinas Th1/Th2/Th17 em soro de pacientes e controles. Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de P foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo “*” (diferença entre pacientes e controles). PC= Pacientes (n=30)/ CT= Controles (n=14).



3.4 Análise de células Treg

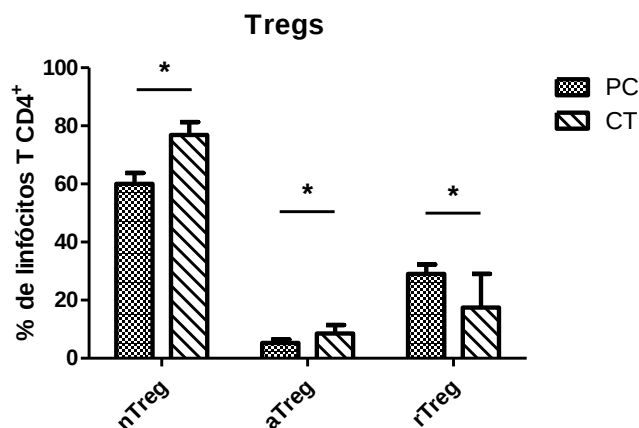
Células T $CD4^+FOXP3^+$ são compostas por três subpopulações individuais com um fenótipo específico: $CD4^+FOXP3^{LO}CD45RA^+$ (células em repouso ou rTreg), $CD4^+FOXP3^{hi}CD45RA^-$ (células Treg ativadas ou aTreg), que apresentam diferentes estágios de diferenciação e são supressivas *in vitro*, e $CD4^+FOXP3^{LO}CD45RA^-$ (células T secretoras de citocinas sem capacidade supressiva ou nãoTreg) (Miyamura *et al.*, 2009). A análise no presente estudo foi realizada de acordo com a classificação desses três subtipos (Figura 4)

Células T $CD4^+FOXP3^+$ foram encontradas em pacientes ($0,5\% \pm 0,15$) e controles ($0,6 \pm 0,3$) sem diferença estatística. A análise dos subtipos de células Treg revelou diferenças dos percentuais dessas células entre controles e pacientes (nTreg $p=0,019$, aTreg $p=0,049$ and rTreg $p=0,05$) (Figura 4 A).

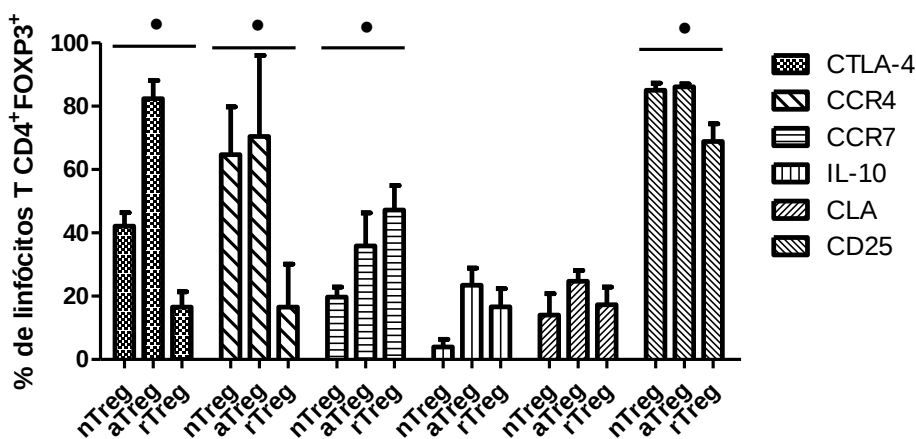
A análise dos subtipos foi aprofundada através da investigação dos marcadores CTLA-4 (supressão por contato), CCR4 (Migração tecidual), CCR7 (migração para linfonodo), IL-10 (citocina supressora) e CLA (migração cutânea) (Figure 4B). Diferença significativa foi observada na comparação intragrupo (paciente x paciente) na expressão de CTLA-4 ($p=0,0009$), CCR-4 ($p=0,0025$), CD25 ($p=0,0309$) com as células aTreg os expressando em um percentual maior, e de CCR7 ($p=0,0157$), expressado em um maior percentual por linfócitos rTreg (Figure 4B).

Figure 4: Subpopulações de células Treg (A) e de marcadores (B) em análise ex vivo de pacientes antes do tratamento. Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SD. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de P foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo “*” (diferença entre pacientes e controles) e “•” (diferença entre os grupos de pacientes). PC= Pacientes (n=8)/ CT= Controles (n=6) (Figura 22).

A)



B)



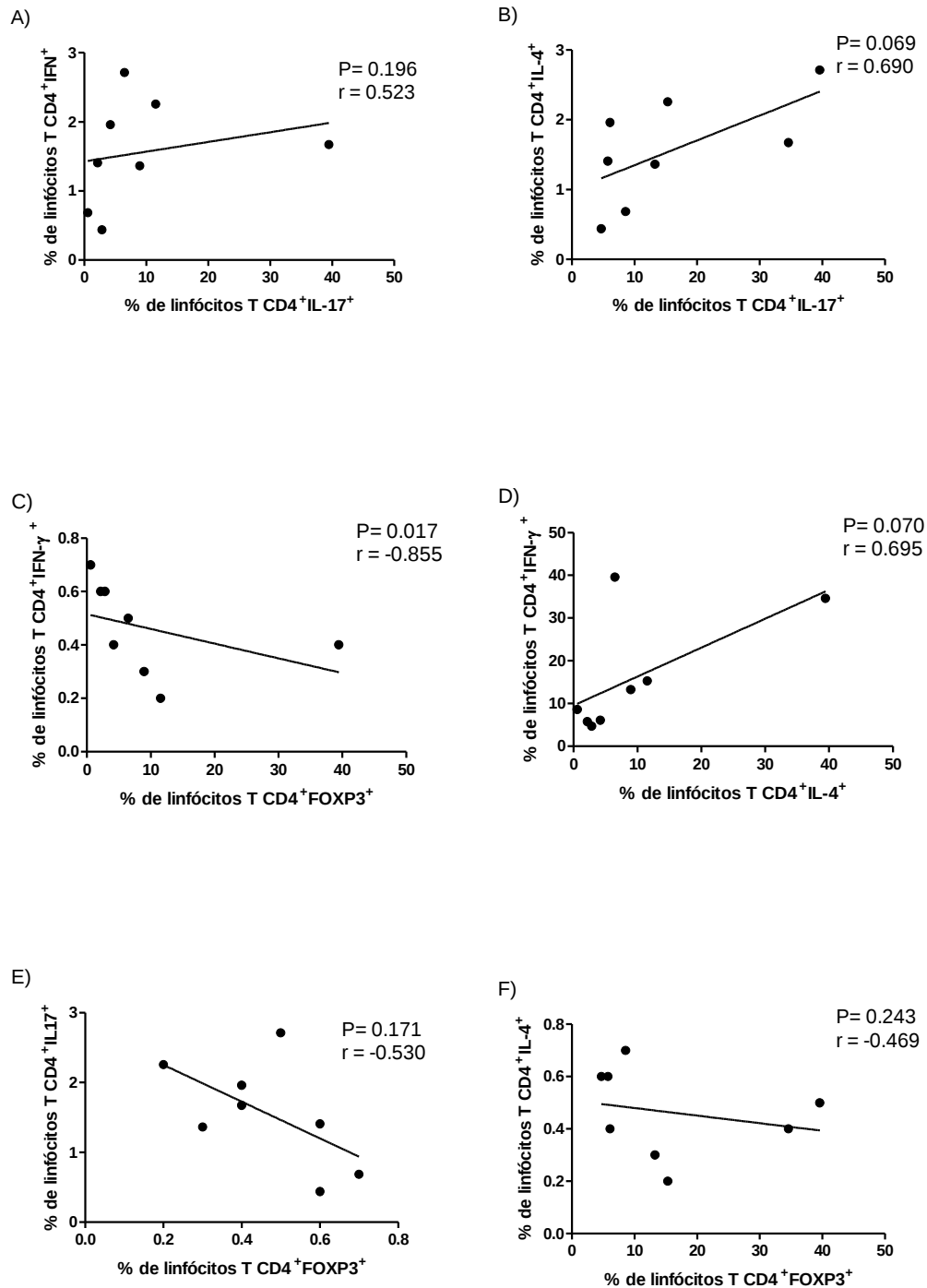
3.5 Correlações entre células Th1, Th2, Th17 e Treg

Para verificar a possível existência de associações entre os perfis de células T CD4⁺, citocinas/fator de transcrição considerados definidores para diferentes perfis foram comparados: Th1xTh2 (IFN- γ x IL-4), Th1xTh17 (IFN- γ x IL-17), Th2xTh17 (IL-4 x IL-17) e Th17xTreg (IL-17 x Foxp3), Th1xTreg (IFN- γ x Foxp3) e Th2xTreg (IL-4 x Foxp3) (Figura 5).

Correlação significativa e negativa foi encontrada na comparação Th1xTreg (P=0,017, r=-0,855) (Figura 5C). Embora não significativas, é relevante mencionar

que correlações positivas foram encontradas para os perfis Th1xTh17 ($P=0,19$, $r=0,523$) e negativas para Th17xTreg ($P=0,17$ e $r=-0,530$).

Figura 5: Correlação entre os perfis Th1/Th2/Th17 e Treg: A)Th1xTh17; B)Th2xTh17; C) Th1xTreg; D) Th1xTh2; E) Th17xTreg; F) Th2xTreg. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de P foram menores que 0,05 (**Figura 23**).



4. Discussão

A diversidade de mecanismos e citocinas relacionadas à resposta imunológica na LTA destacam a sua complexidade. Sendo assim, o entendimento da resposta imune protetora e patológica na infecção por leishmanias é importante para intervenções e *design* racional de vacinas. Nesse estudo, descrevemos o perfil Th1, Th2 e Th17 frente ao estímulo *in vitro* com PMA mais ionomicina, o perfil Treg *ex vivo*, além da presença de algumas citocinas no soro de pacientes com LTA ativa.

Nas culturas de PBMC com os mitógenos PMA e ionomicina foi observada a expressão das citocinas do tipo 1 (IFN- γ e TNF) e do tipo 2 (IL-4 e IL-10), com o IL-4 sendo expresso de maneira significativa. Foi observada também a expressão simultânea de citocinas com papéis opostos, com IL10 e IFN- γ ou TNF e IL-4. Estudos anteriores do nosso grupo (Brelaz *et al.*, 2012) também revelaram a expressão de citocinas com um perfil Th2 em culturas de pacientes com LTA ativa, indicando a existência de uma imunomodulação no início da infecção. Essas citocinas já foram associadas a mecanismos de proteção (perfil Th1) e patogênese (perfil Th2) na LTA, mas sabe-se que a sua quantidade, produção balanceada, e momentos de liberação são determinantes na evolução da doença (Baratta-Masini *et al.*, 2007, Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012; Pala *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2012). Isso reforça a importância de se avaliar também a produção simultânea de citocinas consideradas de perfis opostos, indicando a existência de heterogeneidade entre as produções que poderia implicar na capacidade efetora dessas células. Todos esses elementos colocam em perspectivas a existência de outros mecanismos imunes e outros perfis além do paradigma Th1xTh2, como de células Treg e Th17. Estes vem sendo apontados como importantes na evolução dos quadros clínicos na LTA (Nylen, Gautam, 2010).

A resposta Th17 surge provavelmente como uma resposta inicial a um grande número de patógenos que não são eficientemente eliminados pela resposta do tipo Th1, requerendo inflamação tecidual mais exacerbada para tal propósito. Ela é ativada por uma combinação das citocinas IL-6 e TGF- β , além dos fatores de transcrição ROR γ T, ROR α e Stat3. Esse perfil e sua funcionalidade estão relacionados com a produção de IL-17, IL-22, IL-21, e IL-6, com IL-23 ajudando na sua manutenção (Bettelli *et al.* 2008; Ouyang *et al.*, 2008; Schmidt-Weber *et al.*, 2007). No presente estudo, observamos a presença significativa das citocinas IL-17

e IL-23 produzida por PBMCs de pacientes em cultura. A primeira está associada com indução de mediadores inflamatórios e a segunda com a estabilização do perfil Th17 e a sua patogênese (Bettelli *et al.* 2008; Langrish *et al.*, 2005). A avaliação de citocinas em soro dos pacientes também indicou a presença da citocina IL-6 de maneira significativa, sendo esta associada a indução do perfil Th17. Trabalhos desenvolvidos por Bacellar *et al.* (2009), Boaventura *et al.* (2010), Katara *et al.* (2012) indicaram o provável envolvimento do perfil Th17 e da citocina IL-17 no progresso e patogênese da leishmaniose cutânea, mucosa e visceral, respectivamente. Por outro lado, Novoa *et al.* (2011) e Pitta *et al.* (2009) demonstraram papéis protetores nas infecções por *Leishmania tegumentar* e visceral, respectivamente. No presente trabalho e em outro realizado por nosso grupo (Souza *et al.*, 2012), esse perfil parece estar associado com mecanismos patogênicos.

Em relação às células Treg, evidências indicando que as Tregs poderiam estar envolvidas no controle da imunidade anti-infecção são provenientes de estudos em diversos modelos de infecção por *Leishmania*, *Plasmodium* e *Schistosoma* (Belkaid *et al.*, 2002, 2007). Células Treg com funções imunossupressoras e produção de IL-10 foram identificadas em lesões de pele e em PBMC de pacientes com LTA, além de terem sua função associada a resolução de lesões crônicas. No entanto, como foram sugeridos papel na patogênese e no controle da doença, sua real função na resolução ou perpetuação nas infecções humanas não está completamente elucidada (Bourreau *et al.*, 2009; Campanelli *et al.*, 2006; Carneiro *et al.*, 2009; Diaz, *et al.*, 2010; Rodriguez- Pinto *et al.*, 2012; Salhi *et al.*, 2008).

No presente trabalho, observamos a presença dessas células e das subpopulações (aTreg, rTreg e nTreg) em pacientes e controles *ex vivo*, com os controles apresentando percentuais significativos dessas células. Isso provavelmente ocorre por duas razões: através da inibição do perfil Treg por células Th17, que foram observadas de maneira significativa nos pacientes; ou devido à migração dessas células para os tecidos, onde estariam realizando suas funções efectoras (Belkaid, 2007; Pala *et al.*, 2000; Ziegler, Buckner, 2009).

Em relação às subpopulações de células Treg foi observada a expressão dos marcadores CD25, CCR4, CCR7, CLA, IL-10 e CTLA-4 em diferentes níveis. Das Treg avaliadas a maioria eram nTregs, o que está de acordo com outro estudo (Miyara *et al.*, 2009). Quando considerando a expressão significativa de diferentes

marcadores por essas subpopulações, foi visto que a maioria dessas células expressavam CD25, e que as aTreg expressavam, CCR4 e CTLA-4 e as rTreg expressavam CCR7. As células Tregs realizam suas funções por mecanismos de citólise, produção de citocinas inibitórias (como IL-10 e TGF- β), interrupção metabólica e através de inibição direta por contato. Nesse último mecanismo, estudos sugerem o papel do CTLA-4, potente imunossupressor, atuando através da inibição direta de células apresentadoras de antígenos e na limitação da ativação de linfócitos T efetores (Belkaid *et al.*, 2007; Sakaguchi *et al.*, 2010; Vignali *et al.*, 2008).

Em relação ao padrão de migração celular, sabe-se que esse é um complexo processo envolvendo muitas moléculas, que direcionam as células especificamente para um compartimento. O receptor CLA é importante para o acesso à pele, sendo expresso em 10-25% de linfócitos circulantes, o que está de acordo com nossos resultados. Já o receptor de quimiocina CCR4 é fundamental para uma migração eficiente dos linfócitos T para a pele em condições normais e inflamatórias. Sua expressão geralmente está associada a células T efectoras e de memória efectoras. Já as células T virgens preferencialmente migram para órgãos linfóides secundários, o que está associado a alguns receptores, entre eles o CCR7 (Mendes-Aguiar *et al.*, 2009; Mora, Andrian, 2006). Dessa maneira, a expressão desses marcadores está associada à função esperada dessas subpopulações, com resultados significativos podendo indicar maior ou menor ativação celular.

Além da caracterização de cada perfil de resposta imune na população estudada, foi importante verificar a relação entre eles. Ao analisar a correlação entre os perfis Th1, Th2, Th17 e Treg, observamos uma correlação positiva para os perfis Th17xTh1 e correlação negativa entre os perfis Th17xTreg, sendo significativa e negativa a correlação entre TregxTh1. Essas observações podem ser vinculadas as funções antagônicas dos perfis Treg e Th17, que necessitam de citocinas TGF- β para sua indução e cuja diferenciação para Th17 depende também de IL-6. Além disso, possuem os fatores de transcrição FOXP3 e ROR γ t que se antagonizam fisicamente, daí a inibição de um perfil pelo outro (Betteli *et al.*, 2008; Ziegler, Buckner, 2009). Já a função imunossupressora das células Treg, que ajuda a manter um equilíbrio nas infecções por LTA, justifica o antagonismo das funções Treg e Th1 (Nylen, Gautam, 2010).

Embora PBMC sejam de melhor obtenção ao comparar com células de infiltrados inflamatórios de lesões ou de biopsias, é importante destacar que essas últimas

podem conter células para avaliar um perfil de resposta imune mais fidedigno. Isso pode ter sido um fator limitante para nossas observações, já sugerido por outros grupos (Belkaid, 2007; Pala *et al.*, 2000), principalmente em relação às células Treg, que poderiam estar acumuladas nos tecidos (Belkaid, 2007). No entanto, dado a complexidade dos procedimentos e riscos envolvidos nesses estudos, uma perspectiva do nosso trabalho é o acompanhamento dos pacientes em diferentes períodos após tratamento, para analisar células mais específicas na circulação (Pala *et al.*, 2000).

No presente estudo vimos que os pacientes apresentaram um perfil Th2 na produção de citocinas, produção de citocinas Th17 e a presença de células Treg com diferentes subpopulações. As células aTreg expressaram significativamente os marcadores CCR4, CTLA-4 e as rTreg CCR7. Correlações positivas e negativas entre os perfis foram encontradas, sendo a dos perfis TregxTh1 significativa, indicando a existência diversos mecanismos imunológicos no desenvolvimento da LTA.

Nosso estudo mostrou que a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro na LTA é dinâmica, e poderá contribuir em futuros estudos para desenho apropriado de intervenções imunológicas em pacientes.

Agradecimentos:

Agrademos a plataforma PDTIS/Citometria de Fluxo (RPT08F)- FIOCRUZ. Agradecemos a L. F. da Rocha pelo apoio técnico (FACEPE-FIOCRUZ). Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [472880/2009-8] e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [23038 003155 / 2011-37].

6 CONCLUSÕES

- a) O balanço na proporção de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ por pacientes com diferentes formas clínicas da doença revela que a proporção dessas células é importante para cicatrização das lesões na LTA.
- b) Os estudos *ex vivo* evidenciam que o tratamento com antimonial não induz nenhuma mudança deletéria na proporção de linfócitos T na corrente sanguínea.
- c) Transcritos para TNF e IFN- γ indicam a existência de citocinas do tipo 1 em pacientes com LTA ativa. Isso pode ser devido à diferenças na indução e produção de transcritos, à diferenças na secreção e produção citocinas com o tempo e/ou devido à participação de outras células mononucleadas, como monócitos.
- d) A evolução na LTA observada pela produção de IL-4 e IL-10 e de TNF e IFN- γ , respectivamente, no início e final da doença, parece estar relacionada a desregulação imunológica temporária e mecanismos reguladores que envolvem a citocina IL-10. Essas respostas parecem estar associadas com a cura e/ou proteção na LTA.
- e) A presença significativa de citocinas consideradas indutoras e características do perfil Th17 (IL-6, IL-23 e IL-17) em pacientes com LTA ativa sugerem a associação desse perfil com a patogênese da doença.
- f) A presença significativa de IL-10 em todas as formas clínicas da doença sugere que balanço entre uma resposta protetora e patológica parece ser decorrente da participação de células Treg.
- g) A expressão significativa pelos pacientes de CD25, CTLA-4, CCR4 e CCR7 nas subpopulações de células Treg (aTreg, nTreg e rTreg) observadas nos

estudos *ex vivo* mostram a associação a mecanismos de imunossupressão e migração tecidual na população do presente estudo.

- h) Portanto, a presente tese revelou fatores que contribuíram com os estudos relacionados à susceptibilidade e proteção na LTA, além de novas informações na busca de antígenos relevantes para serem utilizados em futuras intervenções imunológicas nessa doença, uma vez que as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* foram capazes de induzir uma resposta imune específica por parte dos pacientes com LTA.

7 PERSPECTIVAS

- a) Avaliar a resposta Th17 e Treg em pacientes com diferentes quadros clínicos (antes, durante e após o tratamento, além dos curados espontaneamente) utilizando as frações antigênicas de *Leishmania* através de diferentes métodos imunológicos (Citometria, qPCR, ELISA/CBA), em diferentes tempos e com diferentes amostras (sangue, soro, sobrenadante e biópsias de lesões).
- b) Investigar a regulação recíproca das células Th17 e Treg.
- c) Estudos genéticos para avaliar os polimorfismos em vias de diferentes mediadores imunológicos em pacientes com LTA.

REFERÊNCIAS

- AJDARY, S. M. H. et al. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. **Infection and immunity**, Washington, v. 68, n. 4, p 1760-1764, 2000.
- ALMEIDA, A. F. et al. 2010. Immunophenotypic characterization of patients with American cutaneous leishmaniasis prior to and after treatment in Pernambuco, Brazil. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, Botucatu, v.17, n.2, p.230-234, 2010.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, Nova Iorque, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.
- ANDRADE, M. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 229-233, 2005.
- ANTONELLI, L. R. V. et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, Amsterdam, v.101, p. 226-230, 2005.
- ARAUJO, M. et al. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. **Journal of infectious disease**, Oxford, v.190, p.1797–1803, 2004 .
- AUTISSIER, P. et al. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. **Cytometry Part A**, Malden, v. 77, n. 5, p. 410-419, 2010.
- BACELLAR, O. et al. IL-17 Production in Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of infectious disease**, Oxford, v.200, n.1, p. 75-78, 2009.
- BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n.12, p. 6734-6740, 2002.
- BARAN, J. et al. Three-Color Flow Cytometry Detection of Intracellular Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Comparative Analysis of Phorbol Myristate Acetate-Ionomycin and Phytohemagglutinin Stimulation. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.8, n. 2, p. 303-313, 2001.
- BARATTA-MASINI, A. et al. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 12, p. 839-849, 2007.
- BASANO S. A.; CAMARGO L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, p.328-37, 2004.

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

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

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

BIRNBAUM, R.; CRAFT, N.. Innate immunity and Leishmania vaccination strategies. **Dermatologic clinics**, Philadelphia, v.29, n.1, p.89-102, 2011

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. 625-630, 2007.

BOAVENTURA, V. S. et al. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.40, p.2830–2836, 2010.

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

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

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

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

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

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., 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.

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, Nova Iorque, v.279, n.2, p.180-186, 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. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, Malden, v. 14, n. 10, p. 1-9, 2009.

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

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

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.

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

CARNEIRO, F.P. et al. Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v31, n.10, p.646-651, 2009.

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

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-gamma production. **Human Immunology**, New York, v. 70, n. 6, 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., PIRMEZ, C., DA-CRUZ, A. M. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, n.S1, p. 173-178, 2002.

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

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

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

CUMMINGS, H.E.; TULADHAR, R.; SATOSKAR, A.R. (2010). Cytokines and their STATs in cutaneous and visceral leishmaniasis. **Journal of biomedicine & biotechnology**, Cairo, 294389, 6 pages, 2010.

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

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

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

DE BRUIJN, M. H. L.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 52, p. 45-58, 1992.

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

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

DEKNUYDT, F. et al. IL-1 β and IL-2 convert human Treg into Th17 cells. **Clinical Immunology**, Boston, v.131, n.2, P. 298-307, 2009

DÍAZ, Y.R. 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. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v.202, n.3, p.406-15, 2010.

DUTHIE, M. S. et al. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v.30, n.2, p.134-41, 2012.

EASTAFF-LEUNG, N. et al. Foxp3⁺ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. **Journal of clinical immunology**, Nova Iorque, v.30, n.1, p.80-90, 2010.

ERFEA, M.C.B et al. Efficacy of Synthetic Peptides RP-1 and AA-RP-1 against *Leishmania* Species In Vitro and In Vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.56, n. 2, p.658-665, 2012

ETTINGER, N.A.; WILSON, M.E. Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. **PloS neglected tropical diseases**, São Francisco, v.2, n.6, e252, 2008.

FALCÃO, C. S. et al. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. **International journal for parasitology**, Nova Iorque, v. 42, n.8, p.771–780, 2012.

FARIA, A. M. C. et al. Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging. **Neuroimmunomodulation**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 4-6, p. 365-379, 2008.

GODOY-RAMIREZ, K. et al. Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v.292, n.1-2, p.1-15, 2004.

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

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

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. 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.

HORTA, M.F. et al. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**. New York, v. 2012: p.11, 2012.

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

KATARA, G. K. et al. Evidence for Involvement of Th17 Type Responses in Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n.6, e1703, 2012.

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

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

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

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

LANGRISH, C.L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **Journal of experimental medicine**, Nova Iorque, v.201, n. 2, p. 233-240, 2005

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.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against Leishmania parasites. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 213, n. 3-4, p.377-87, 2008.

MACEDO, A. B. et al. Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 167, n.3, p.505-513, 2012.

MAIZELS R.M. Infections and allergy–helminths, hygiene and host immune regulation. **Current opinion in immunology**, Philadelphia, v. 17, n.6, p. 656 – 661, 2005

MAURER, M.; DONDJI, B.; VON STEBUT, E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Medical microbiology and immunology**, Berlin, v.198, n.3, p.137-146, 2009.

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

MENDES-AGUIAR, C. O. et al. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by Leishmania antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, Londres, v.157, n.3, p.377-84, 2009

MIYARA, M. et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. **Immunity**, Cambridge, v.30, n.6, p.899-911, 2009.

MORA, J.R.; Andrian, U.H. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. **Trends in immunology**, Oxford, v.27, n.5, p.235-243, 2006

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

NEWLOVE, T. et al. Antihelminthic therapy and antimony in cutaneous leishmaniasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients co-infected with helminths and *Leishmania braziliensis*. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v.84, n.4, p.551-555, 2011

NOVOA, R. et al. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. **Parasite Immunology**, Oxford, v.33, n.2, p.132–136, 2011.

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

O'NEAL, S. E. et al. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v.195, p.142–148, 2007.

OGHUMU, S. et al. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. **Experimental parasitology**, Nova Iorque, v.126, n.3, p. 389-396, 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. **Cutaneous Leishmaniasis- Why are you neglecting me?** Geneva, 2007.

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

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

OUYANG, W.; KOLLS, J.K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, Cambridge, v.28, n.4., p.454-467, 2008.

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

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

PF AFFL M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, London, v.29, n.9, e45, 2001.

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

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

PISSINATE, J. F. et al. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v.336, p.193-202, 2008.

PITTA, M.G.R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of clinical investigation**, Nova Iorque, v.119, p.2379–2387, 2009.

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**, Nova Iorque, v. 272, n.2, p.144-153, 2012.

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

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

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

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

RITTER, U. et al. The control of *Leishmania* (*Leishmania*) major by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. **Microbes and Infection**, Merced, v. 6, n. 6, p. 559-565, 2004.

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

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

ROCHA, P. N. et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 180, n. 5, p. 1731-1734, 1999.

RODRIGUEZ-PINTO, D. et al. Regulatory T cells in the pathogenesis and healing of chronic human dermal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)* species. **PloS neglected tropical diseases**, São Francisco, v.6, n.4, e1627, 2012.

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

RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, Oxford, v. 29, n. 12, p. 671-678, 2007.

SACHDEVA, N.; ASTHANA, D. Cytokine quantitation: technologies and applications. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 1, n. 12, p. 4682-4695, 2007.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. **Nature Immunology**, Nova Iorque, v.4, n.1, p. 10-11, 2003.

SAKAGUCHI, S. et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nature Immunology**, Nova Iorque, v.10, n.7, p.490-500, 2010.

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

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

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

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

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

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. **Lancet infectious diseases**, Nova Iorque, v.6, p.342–349, 2006.

SHARMA,U.; SINGH,S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, Nova Deli, vol.47, p.412-423, 2009.

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

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

SOUZA, M.A. et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Clinical Cure, With or Without Chemotherapy, **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v.76, n.2, p. 175-180, 2012.

SOUZA, M.A. et al. Immunity against Leishmaniasis. **Leishmaniasis: Symptoms, Treatment and Potential Complications**. 1ed. NOVA PUBLISHER, 2013, At press. ISBN: 978-1-62417-700-2

SRIVASTAVA, A. et al.. Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania donovani* amastigote-specific antigens. **Molecular and cellular biochemistry**, The Hague, v.359, n.1-2, p.359-368, 2012.

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

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

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.

TIUMAN T.S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International journal of infectious diseases**, Hamilton, v.15, n. 8, e525-32, 2011

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

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

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

VIGNALI, D.A.; COLLISON, L.W.; WORKMAN, C.J. How regulatory T cells work. **Nature reviews – immunology**, Londres, v.8, n.7, p.523-532, 2008.

ZIEGLER, S.F.; BUCKNER, J.H. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. **Microbes and infection**, v.11, n.5, p.594-598, 2009.

Apêndice A**Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde**Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES**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/nº, Recife, fone: (81) 34215003.

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

Apêndice B

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

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

Projeto: “**Caracterização 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/nº, Recife, fone: (81) 34215003.

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

Apêndice C



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



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/nº, Recife, fone: (81) 34215003.

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

Apêndice D- Trabalhos e estudos realizados no doutorado

1. Lista de outros trabalhos relacionados à tese publicados no período do doutorado

- **BRELAZ, M.C.A.** 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.
- ALMEIDA, A. F.; **CASTRO, M.C.A.B.**; OLIVEIRA, AP; SOUZA, MA; PEREIRA, VRA. Immunophenotypic characterization of patients with American cutaneous leishmaniasis prior to and after treatment in Pernambuco, Brazil. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, Botucatu, v.17, n.2, p.230-234, 2010.
- SOUZA, M.A.; **CASTRO, M.C.A.B.**, OLIVEIRA A.P. et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Clinical Cure, With or Without Chemotherapy, **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v.76, n.2, p. 175-180, 2012.
- OLIVEIRA, A.P.; **CASTRO, M.C.A.B.**; ALMEIDA, A.F. 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
- SOUZA, M.A.; **CASTRO, M.C.A.B.**, OLIVEIRA A.P. et al. Immunity against Leishmaniasis. **Leishmaniasis: Symptoms, Treatment and Potential Complications**. 1ed. NOVA PUBLISHER, 2013, At press. ISBN: 978-1-62417-700-2

2. Lista de resumos relacionados à tese publicados no período do doutorado

- XLVIII Congresso f the Brazilian Society of Tropical Medicine. 2012, Rio de Janeiro. Preliminary evaluation of Treg cells in American cutaneous leishmaniasis patients: livro de resumos. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2012
- XLVIII Congresso f the Brazilian Society of Tropical Medicine. 2012, Rio de Janeiro. Th17, Th1 and Th2 cytokine production in patients with active American cutaneous leishmaniasis: livro de resumos. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2012

3. Artigo não relacionados a tese publicado no período do doutorado

- CAVALCANTI, Y.V.; **BRELAZ, M.C.A.**; NEVES, J.K.; FERRAZ, J.C.; PEREIRA, V.R. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the

Development of Pulmonary Tuberculosis. **Pulmonary Medicine**, 2012:745483, Epub, 2012. doi: 10.1155/2012/745483.

4. Lista de cursos realizados no período do doutorado

- 2012: Vaccinology Course. Carga horária: 176h. Instituto Pasteur, Paris, França.
- 2012: 35th Annual Course in Cytometry- Research methods and applications. Carga horária: 40h. Cytometry Educational Associates/National Flow Cytometry Resource, Maine, Estados Unidos.
- 2011: Genotipagem de SNPs: Desafios e Soluções para avaliação de polimorfismos. Carga horária: 24h. Life Technologies, São Paulo, Brasil.
- 2011: Curso Latinoamericano de Imunologia. (Carga horária: 60h). Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Anexo A- Parecer do Comitê de ÉticaCentro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

Ministério da Saúde

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CPqAM/FIOCRUZ

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

Pesquisador responsável: Valéria Rego Alves Pereira

Instituição onde se realizará o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 21/11/2005

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 60/05

Registro no CAEE: 0757.0.095.000-05

PARECER

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

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

Recife, 08 de março de 2006

Ana Maria A. Santa

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

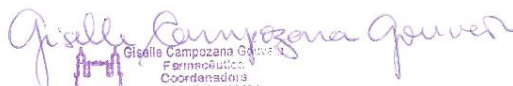
Observação:

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

Anexo B - Prorrogação do parecer do Comitê de Ética**DECLARAÇÃO**

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

Recife, 08 de setembro de 2009.


Giselle Camposana Gouveia
Ferreira
Coordenadora
Met. SIAPE 0453116
CPqAm / FIOCRUZ

Anexo C - Parecer do Comitê de Ética- Projeto Treg

Título do Projeto: "Estudo do papel de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ na Leishmaniose Tegumentar".

Pesquisador responsável: Valéria Rêgo Alves Pereira.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 23/12/2009

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 01/10

Registro no CAAE: 00082.0.095.000-09

PARECER Nº 15/2011

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

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 04 de maio de 2014. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 04 de maio de 2011.



Valéria Camposana Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0463276
CPqAM / FIOCRUZ

Observação:**Anexos:**

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 04/05/2012.

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

