

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ



Curso de Pós-Graduação em Patologia

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA IL-15 E DA IL-12 NA
IMUNORREGULAÇÃO DA LEISHMANIOSE
HUMANA**

VIRGINIA FREITAS DE SÁ OLIVEIRA





UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ



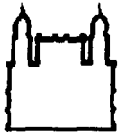
Curso de Pós-Graduação em Patologia

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA IL-15 E DA IL-12 NA
IMUNORREGULAÇÃO DA LEISHMANIOSE
HUMANA**

VIRGINIA FREITAS DE SÁ OLIVEIRA

Salvador-Bahia, 1998



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ



Curso de Pós-Graduação em Patologia

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA IL-15 E DA IL-12 NA
IMUNORREGULAÇÃO DA LEISHMANIOSE
HUMANA

VIRGINIA FREITAS DE SÁ OLIVEIRA

Professor-orientador: Aldina Barral

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de mestre em
Patologia Experimental

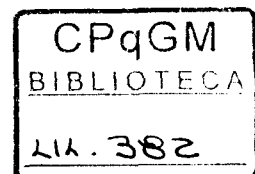
Salvador - Bahia, 1998

C Pq G M
Biblioteca

FICHA CATALOGRÁFICA

Salvador - Bahia.

O48	Oliveira, Virginia Freitas de Sá Avaliação do papel da IL-15 e da IL-12 na imunoregulação da Leishmaniose humana / Virginia Freitas de Sá Oliveira. _ Salvador : Faculdade de Medicina da UFBA / CPqGM, 1998. 120p.:il.
	Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Universidade Federal da Bahia, 1998.
	1. Leishmaniose. 2. Imunidade celular. 3. Citotoxicidade imunológica. I. Título.
	CDU 616.993.161:577.27



616.993.161:577.27
O48

DEDICATÓRIA

*A Nélia, minha mãe, com saudade.
A Ovídio, meu pai.*

AGRADECIMENTOS

Especialmente a Dr^a. Aldina Barral pela orientação, incentivo e oportunidade de desenvolver este trabalho.

A todos os pacientes que participaram deste estudo.

Ao Dr. Manoel Barral-Netto por tantas sugestões durante todas as fases de desenvolvimento deste projeto.

Aos Hospitais Prof. Edgar Santos, Couto Maia e Clériston Andrade onde foram atendidos os pacientes com LVA.

A Geraldo pelo incentivo e auxílio na fase final.

A Vera Vinhas pela orientação na realização prática dos experimentos e pelo apoio nos ensaios de ELISA .

A Viviane Boaventura pelo apoio nas atividades de laboratório, principalmente nos ensaios de citotoxicidade.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente em qualquer das etapas deste projeto. Em especial a:

Dr. Hélio Lessa
Dr. Jackson Costa
Dr. Renato Pires Freitas
Dra Virginia Café
Sílvia Cardoso
Rosália M. da Silva
Glória Orge

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	6
1.2 FORMAS CLÍNICAS E RESPOSTA IMUNE DAS LEISHMANIOSES.....	7
1.2.1 <i>Leishmaniose visceral</i>	7
1.2.2 <i>Leishmaniose tegumentar</i>	9
1.3 MODELOS ANIMAIS E ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE.....	12
1.4 PAPEL DA IL-12 NA IMUNOREGULAÇÃO.....	15
1.5 PAPEL DA IL-15 NA IMUNOREGULAÇÃO.....	16
2 OBJETIVO PRINCIPAL.....	20
3 JUSTIFICATIVA.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 PACIENTES E CONTROLES.....	22
4.2 REAGENTES.....	24
4.3 PREPARO DO ANTÍGENO DE LEISHMÂNIA.....	24
4.4 SEPARAÇÃO DE CMSP.....	25
4.5 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO.....	26
4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	26
4.7 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE IFN- γ	27
4.8 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE IL-12 P40 NO SORO.....	28
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5 RESULTADOS.....	30
5.1. AÇÃO DE IL-15 E DE IL-12+ IL-15 NA LVA.....	30
5.1.1. <i>Estudo de dose resposta de IL-15 na LVA e em controles normais</i>	30
5.1.2 <i>Ação de IL-12 e de IL-15 na linfoproliferação</i>	31
5.1.3. <i>Ação de IL-15 e de IL-12+IL-15 na produção de IFN-γ</i>	32
5.1.4. <i>Ação de IL-12 e de IL-12+IL-15 na resposta citotóxica</i>	34
5.2. AÇÃO DE IL-15 DE IL-12+ IL-15 NA LCD.....	37
5.3. AÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-IL-12 E ANTI-IL-15 NA LCM.....	39
5.3.1 <i>Inibição da IL-15</i>	39
5.3.2 <i>Ação de anti-IL-12 e de anti-IL-15 na linfoproliferação</i>	40
5.3.3 <i>Ação de anti-IL-12 e de anti-IL-15 na produção de IFN-γ</i>	42
5.3.4 <i>Ação de anti-IL-12 e anti-IL-15 na citotoxicidade</i>	42
5.4. PAPEL DE IL-12 P40 SÉRICA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE.....	45

6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÕES	57
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9 APÊNDICES	71
TABELA A. LINFOPROLIFERAÇÃO EM PACIENTES COM LVA.	71
TABELA B. LINFOPROLIFERAÇÃO EM CONTROLES NORMAIS.	72
TABELA C. LINFOPROLIFERAÇÃO EM PACIENTES COM LCM.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

CD - Cluster of differentiation

CMSP - Células mononucleares do sangue periférico

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

IE - Índice de estimulação

IFN- Interferon

IL - Interleukin

IL-2R - Interleukin-2 receptor

LAK - Linfocyte activated killer (cell)

LCD - Leishmaniose cutânea difusa

LCL - Leishmaniose cutânea localizada

LCM - Leishmaniose cutânea mucosa

LTA - Leishmaniose tegumentar americana

LVA - Leishmaniose visceral americana

MAPK - Mitogen activated protein kinase

MIP- α - Macrophage inflammatory protein-1 α

NK - Natural killer

PWM - Pokeweed mitogen

SBN - Sobrenadante

TGF- β - Transforming growth factor- β

Th - T helper

WHO - World Health Organization

RESUMO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA IL-15 E DA IL-12 NA IMUNOREGULAÇÃO DA LEISHMANIOSE HUMANA.

A resistência contra a infecção pela leishmânia é mediada pela resposta imune celular caracterizada por ativação macrofágica e produção de citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ . Na leishmaniose visceral americana (LVA) ocorre ausência de resposta imune celular específica que pode ser mediada por substâncias séricas solúveis. A leishmaniose tegumentar inclui um amplo espectro de doenças que variam da forma não responsiva leishmaniose cutânea difusa (DCL), a hiperresponsiva leishmaniose cutânea mucosa (LCM). A IL-15 é uma citocina que tem atividades biológicas semelhantes a IL-2 incluindo estimulação da proliferação de células T e células NK ativadas. O objetivo deste estudo foi determinar o papel de IL-15 na resposta imune da leishmaniose humana e o potencial sinergismo com IL-12. Nós estudamos CMSP de 19 pacientes com LVA, 19 com LCM e 3 com LCD, após cultivo por 5 dias na presença de antígeno de leishmânia, IL-15 e/ou IL-12 nos pacientes com LVA e com LCD ou de anticorpos monoclonais anti-IL-12 ou anti-IL-15 nos pacientes com LCM. Linfoproliferação, dosagem de IFN- γ por ELISA e resposta citotóxica contra células tumorais foram os parâmetros utilizados na avaliação. Investigamos também se IL-12 p40 tem um papel como imunossupressor sérico na leishmaniose. Através de ELISA nós comparamos a concentração sérica de IL-12 p40 em 15 pacientes com LVA, incluindo 9 após tratamento, 10 pacientes com LTA e 15 controles negativos. CMSP de pacientes com LVA, assim como dos controles normais, apresentaram resposta proliferativa dose-dependente a IL-15 tanto com meio quanto com antígeno de leishmânia. IL-15 não aumentou a produção de IFN- γ em pacientes com LVA ou com LCD como também não apresentou sinergismo com a IL-12. Da mesma forma a IL-15 foi capaz de induzir aumento da citotoxicidade e esta indução foi maior que a IL-12. Como já havia sido previamente demonstrado, CMSP de pacientes com LCM mostraram uma exacerbação da citotoxicidade após estimulação com antígeno de leishmânia. Esta resposta foi heterogênea e não foi negativamente regulada pela neutralização de IL-12 ou de IL-15. A linfoproliferação por CMSP de pacientes com LCM também não foram revertidas com anticorpos anti-IL-12 e/ou anti-IL-15. Anti-IL-12, mas não anti-IL15 diminuiu a produção de IFN- γ . Comparando a média da concentração de IL-12 p40 de pacientes com LVA, LTA e controles normais os resultados foram 283, 109 and 89 pg/ml respectivamente e os elevados níveis dos pacientes com LVA reduziram após o tratamento da doença ($p=0,007$). Nossos resultados sugerem que IL-15 não é importante na resposta imune da leishmaniose humana por ser um mediador inespecífico de citotoxicidade e de linfoproliferação e não induzir produção de IFN- γ na LVA. A resposta imune exacebada na LCM não é revertida pela neutralização in vitro de IL-12 e/ou IL-15. IL-12 p40 é potencialmente um imunossupressor na LVA.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ROLE OF IL-15 AND IL-12 AS IMMUNOREGULATORY MOLECULES IN HUMAN LEISHMANIASIS.

The resistance to leishmania infection is mediated by cellular immune response characterized by macrophage activation and production of cytokines like IL-2, IL-12 and IFN- γ . American visceral leishmaniasis (AVL) is characterized by absence of cellular immune response that can be mediated by soluble serum molecules. Tegumentary leishmaniasis includes a spectrum of diseases that varies from the unresponsive diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), to mucocutaneous leishmaniasis (MCL), the hiperresponsive pole. IL-15 is a cytokine that has biological activities similar to IL-2 including grow stimulation of activated T and NK cells. The aim of this study was to determine the role of IL-15 in the immune response of human leishmaniasis and its potential synergism with IL-12. We studied PBMC of 19 AVL, 19 MCL and 3 DCL patients. After a five day culture in the presence of leishmanial antigens, cytokines (IL-12 and IL-15) or mAbs α -IL-12 or α -IL-15 we evaluated lymphoproliferation, IFN- γ production by ELISA and citotoxicity against tumoral cells. We also invetigated if IL-12 p40 plays a role as serum supressor agent in human leishmaniasis. Using ELISA, we compared the plasmatic concentration of IL-12 p40 in 15 patients with AVL, including 9 after treatment, 10 patients with ATL and 15 controls. PBMC of AVL patients, as well as those from normal controls, showed a dose-response mitogenic response to IL-15. IL-15 did not augment IFN- γ production in AVL or DCL patients nor sinergized with IL-12. In the same manner, IL-15 and in a less extend, IL-12, induced an increase in NK cell citotoxicity. As was previously demonstrated, PBMC of MCL patients showed a high citotoxicity response after stimulation with leishmania antigen. This response was heterogeneous and was not negatively regulated by neutralization of IL-12 or IL-15. Lymphoproferation and IFN- γ production were not abrogated by α -IL-12 or α -IL-15. Comparing the median of IL-12 p40 concentrations of AVL, ATL and controls the results were 283, 109 and 89 pg/ml respectively and the higher levels of AVL patients reduced after treatment ($p=0,007$). Taken together these results suggest that IL-15 is not a important molecule in the immune response of leishmaniasis since it mediates citotoxicity and lymproliferation in a unspecific manner and does not induce IFN- γ production in AVL. The exarcebated immune response in MCL is probably mediated by a great number of stimulus and the blockage of IL-12 and/or IL-15 can not reverse it. IL-12 p40 is a suitable immunosuppressor in human leishmaniasis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Leishmaniose é uma doença endêmica em várias regiões tropicais e subtropicais, onde constitui um importante problema de saúde pública. A incidência mundial é estimada em 1,5 a 2 milhões de casos por ano, com cerca de 500 mil casos de leishmaniose visceral (WHO, 1998). A doença é causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* e a transmissão ocorre num ciclo envolvendo um inseto vetor, do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, que realiza a passagem do parasito entre os hospedeiros vertebrados. A leishmânia tem duas formas de desenvolvimento: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros. Após inoculação na pele, os promastigotas flagelados se transformam em amastigotas e multiplicam-se dentro dos vacúolos das células de linhagem macrófaga. No novo mundo, existem duas formas clínicas de leishmaniose: visceral americana (LVA) e tegumentar americana (LTA), esta última é subdividida nas formas cutânea localizada (LCL), cutâneo-mucosa (LCM) e cutânea difusa (LCD). Nesta variação a espécie do parasito e a resposta imune do hospedeiro estão envolvidos. A forma tegumentar americana é causada por parasitos dos complexos *Leishmania braziliensis* e *L. mexicana*. Parasitos do complexo *L. braziliensis* podem causar LCL ou LCM. Parasitos do complexo *L. mexicana* são associados com LCL e LCD, mas, *L. amazonensis*, que faz parte deste grupo, também pode estar associada, porém mais raramente, com a LCM (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995). A LVA é causada por parasitos do

complexo *L. donovani* tanto no velho quanto no novo mundo e na Bahia foi demonstrada a presença de *L. chagasi* e a *L. amazonensis* em casos de LVA (BARRAL e cols., 1991)

1.2 Formas clínicas e resposta imune das leishmanioses

1.2.1 Leishmaniose visceral

A LVA apresenta uma variação de formas clínicas, que incluem o calazar propriamente dito, e as formas subclínicas que podem curar espontaneamente ou evoluir para a forma aguda. Em uma área endêmica para LVA, CARVALHO e cols. (1992) demonstraram que 50% das crianças permanecem assintomáticas após a soroconversão. O calazar acomete principalmente crianças e apresenta uma relação infecção:doença igual a 18:1, sendo que baixa faixa etária e desnutrição são fatores de risco para desenvolvimento de doença (BADARO e cols., 1986). É caracterizada clinicamente por esplenomegalia, febre, anemia, neutropenia e plaquetopenia (AL-JURAYYAN e cols., 1995). Vários achados do quadro clínico da LVA são atribuídos aos níveis cronicamente elevados de fator de necrose tumoral (TNF) ou caquexina, que é também um marcador de atividade da doença (BARRAL-NETTO e cols., 1991b).

É uma doença comumente fatal se não tratada, sendo que as complicações mais frequentes são sangramento e infecções bacterianas, que ocorrem em cerca de 60% dos casos (ANDRADE e cols., 1990).

Na LVA ocorre imunossupressão que é antígeno específica e mediada por células. O soro destes pacientes tem efeito imunossupressivo inespecífico em linfócitos normais devido a presença de substâncias solúveis como receptor de interleucina-2 (sIL-2R) (BARRAL-NETTO e cols., 1991a). Apresentam também níveis séricos elevados de triglicéridas e de

imunoglobulinas totais e anti-leishmânia (BARRAL e cols., 1986). A LVA é caracterizada imunologicamente por ausência de resposta imune celular antígeno-específica, evidenciada *in vivo* pela ausência de resposta ao teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de leishmânia (reação de Montenegro) e, *in vitro*, pela ausência de proliferação linfocitária e produção de IFN- γ após estímulo com antígeno de leishmânia (CARVALHO e cols., 1989). A resposta imunológica celular se correlaciona com as manifestações clínicas da infecção: crianças com a forma subclínica apresentam níveis baixos de proliferação e produção de IFN- γ , porém superiores aos da forma aguda, ao passo que, pacientes curados, ou com teste de hipersensibilidade tardia positivo, apresentam níveis mais elevados (HOLADAYET e cols., 1993). A análise de RNA-m na cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com calazar documentou a produção de IL-4 e IL-10. Estas citocinas são associadas com ativação de células Th2 e são capazes de suprimir a ativação da resposta imune Th1. Em indivíduos com calazar, a adição de IFN- γ e IL-2, que são citocinas associadas com resposta imune tipo Th1, é capaz de restaurar a resposta proliferativa específica e a produção de IFN- γ , o mesmo acontecendo com a adição de anticorpos monoclonais contra IL-4 ou IL-10 (CARVALHO e cols., 1994). A adição de IL-10 apresenta efeito contrário, ou seja, é capaz de inibir a proliferação linfocitária em indivíduos curados e o RNA-m para IL-10 é expresso em maior quantidade nos linfonodos de pacientes com leishmaniose dérmica pós-calazar, uma doença caracterizada pela persistência do parasito na pele de pacientes tratados para leishmaniose visceral (GHALIB e cols., 1993). A IL-12, uma citocina também relacionada com resposta tipo Th1, quando adicionada à cultura de CMSP de pacientes com forma aguda de doença, é capaz de restaurar a resposta específica, ao passo que, em indivíduos curados é encontrada em maior quantidade no sobrenadante e quando bloqueada com

anticorpos monoclonais leva a inibição da produção de IFN- γ (GHALIB e cols., 1996). No soro da maioria dos pacientes com forma aguda foram encontrados níveis detectáveis de IL-4 e IL-10 (84 e 56%, respectivamente), associado a níveis diminuídos de IFN- γ (SUNDAR e cols., 1997). Estes dados sugerem que existe na LVA uma inibição da ativação macrofágica pela produção de IL-10, caracterizando uma resposta tipo Th-2. Porém, em tecidos de pacientes com forma aguda foi encontrada expressão aumentada de RNA-m para IFN- γ , IL-4 e IL-10 na fase inicial, que revertem após o tratamento curativo da doença (KARP e cols., 1993; KENNEY e cols., 1998). Estes resultados indicam que ocorre a presença de moléculas indutoras e supressoras da resposta imune celular e que não ocorre um padrão definido como Th-1 ou Th-2. Nos modelos murinos, que serão discutidos adiante, estes padrões podem ser diferenciados com maior facilidade. Além da ativação macrofágica através de produção de IFN- γ , tem sido demonstrado que a destruição da célula parasitada por células T CD8⁺ ou por células NK está diminuída na leishmaniose visceral (HARMS e cols., 1996). Esta supressão da citotoxicidade por células NK pode ser revertida após cultivo na presença de IL-12 (BACELAR e cols., 1996). Monócitos de pacientes com LVA são capazes de produzir mediadores solúveis que diminuem a resposta citotóxica em indivíduos normais, porém estes mediadores ainda não foram identificados (CHARKRABARTI e cols., 1996).

1.2.2 Leishmaniose tegumentar

A leishmaniose tegumentar apresenta um espectro de doença que varia desde a leishmaniose cutânea localizada e cutâneo-mucosa (LCL e LCM), que representam o polo responsivo, até a leishmaniose difusa, que representa o polo não responsivo. A LCL

apresenta-se clinicamente com uma úlcera bem delimitada com bordos elevados, localizada, na maioria das vezes, nos membros inferiores e acompanhada de linfadenomegalia satélite. Esta linfadenomegalia pode ser a primeira manifestação da doença (BARRAL e cols., 1995a). A forma mucosa , que ocorre em aproximadamente 3% dos pacientes, é mais agressiva e apresenta-se com presença de múltiplas lesões e com envolvimento e destruição de faringe, laringe e cavidades nasal e bucal (BARRAL-NETTO e cols., 1996). Em nosso meio a LTA é causada principalmente por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (BARRAL e cols., 1991). Ao contrário dos pacientes com LVA, pacientes com LCL e LCM apresentam reação de hipersensibilidade cutânea tardia positiva para antígeno de leishmânia (MONTENEGRO, 1926) e, principalmente na LCM, há uma resposta linfoproliferativa e produção de IFN- γ exarcebada após estímulo com antígeno de leishmânia *in vitro* (CARVALHO e cols., 1985). Enquanto a LCL, na maioria dos casos, responde satisfatoriamente ao tratamento ou cicatriza espontaneamente, a LCM é destrutiva e resistente ao tratamento. Uma hipótese para explicar a patogênese da LCM ou dos casos de LCL com evolução desfavorável seria a presença de citocinas inibidoras da resposta tipo Th-1 na fase inicial da infecção. Nesta fase, CMSP de pacientes com LCM podem apresentar, *in vitro*, produção aumentada de IL-10 e diminuída de IFN- γ , indicando que existe um fenômeno transitório de imunossupressão que pode permitir a multiplicação dos parasitos (ALMEIDA e cols., 1995). Esta imunossupressão pode ser revertida com a adição de anti-IL-10 ou de IL-12. Um outro estudo revelou que em lesões de pacientes com LCL de pior evolução ocorre expressão aumentada de RNA-m para IFN- γ e IL-12, além de maior expressão de IL-10 (LOUZIR e cols., 1998). Confirmando estes achados, MELBY e cols. (1996) demonstraram que IFN- γ e IL-12 estão aumentadas nas lesões mais antigas da LCM, podendo portanto ter um papel importante

na patogênese desta doença. Comparando lesões de pacientes com LCM e LCL, PIRMEZ e cols. (1993) encontraram maior quantidade de RNA-m para IL-4 nas lesões de LCM, enquanto que IFN- γ e IL-2 tinham distribuições semelhantes. IL-4 e IL-10, portanto, podem constituir fatores supressores da ativação macrofágica ou reguladores de outras citocinas como IL-12 e IFN- γ na LCM. Algumas observações sugerem um papel importante de TGF- β na patogenia da LTA. Em modelos murinos, esta citocina leva a aumento da replicação intracelular de *L. braziliensis in vitro* e sua infusão *in vivo* pode mudar o curso da infecção, transformando camundongos previamente resistentes em suscetíveis (BARRAL e cols., 1993). Imunohistoquímica de biópsias de lesões cutâneas revelaram a presença de TGF- β em 8 de 12 pacientes na fase inicial da doença (BARRAL e cols., 1995 b).

Alguns estudos demonstraram aumento da atividade citotóxica em pacientes com LTA, porém ainda não está claro se esta resposta é importante para o controle da infecção ou se contribui para a lesão tecidual. Pacientes com LCM tem resposta com células NK mais acentuada que pacientes com LCL, e, em ambos, a adição de TGF- β ou IL-10 reverte este processo *in vitro* (BARRAL-NETO e cols., 1995). A citotoxicidade contra macrófagos autólogos infectados (*in vitro*), é restrita a pacientes com LCM e não com LCL, sugerindo um papel da citotoxicidade na patogênese desta doença. Neste caso, a citotoxicidade seria também mediada por células T CD8⁺, além das células NK. Anticorpos monoclonais anti-IFN- γ e anti-IL-12 são capazes de reverter a resposta citotóxica de pacientes com LCM (BRODSKYN e cols., 1997). Por outro lado, comparando o padrão fenotípico de células T na LTA, foi demonstrado que pacientes com doença ativa tinham predomínio de células CD4⁺, ao passo que pacientes curados apresentavam percentual

semelhante de células CD4⁺ e de CD8⁺, indicando que as células CD8⁺ tenham um papel importante na proteção (COUTINHO e cols., 1996).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma rara de leishmaniose tegumentar, caracterizada clinicamente por múltiplas lesões nodulares e placas infiltrativas com progressão lenta e sem evidência de visceralização ou envolvimento de mucosas. Como na LVA, os pacientes possuem teste cutâneo negativo (reação de Montenegro), resposta proliferativa linfocitária negativa contra antígeno de leishmânia e títulos elevados de IgG anti-leishmânia. As lesões cutâneas apresentam macrófagos vacuolados com grau variável de parasitismo, porém, em quantidade muito maiores que na LCL ou LCM. Em nosso meio é relacionada a *L. amazonensis* (BITTENCOURT e cols., 1995). As CMSP de pacientes com LCD apresentam padrão de resposta a antígenos de leishmânia com expressão de RNA-m aumentada para IL-2, IL-4 e IL-10 e diminuída para IFN- γ na fase ativa da doença. Após o tratamento, há aumento de IFN- γ e diminuição de IL-10, porém, esta aparente mudança para um padrão tipo Th-1 não confere proteção a longo prazo (BONFIM e cols., 1996).

1.3 Modelos animais e estudo da resposta imune

A utilização de modelos experimentais na leishmaniose muito tem contribuído para a compreensão da imunopatogênese da leishmaniose, sendo que a maioria dos estudos tem sido realizada com camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados com *L. major*. A ativação de macrófagos por citocinas derivadas de células T é necessária para o controle da infecção. A via final de destruição do parasito pelo macrófago murino envolve produção de óxido nítrico (REINER & LOCKSLEY, 1995). O camundongo BALB/c, que é um animal suscetível, produz citocinas com um padrão do tipo Th-2, ou seja, secreta IL-

4, IL-5 e IL-10, com produção aumentada de imunoglobulinas e ativação macrofágica ineficiente. Ao contrário, camundongos da linhagem C57BL/6 ou CBA apresentam níveis elevados de IFN- γ e IL-2, caracterizando resposta imune tipo Th-1, e controlam a doença (SCOTT e cols. 1989). Camundongos da mesma raça podem ser resistentes a uma cepa de leishmânia e suscetíveis a outra, como ocorre com o C57BL/10, que é resistente a infecção por *L. major* e, quando infectados com *L. amazonensis*, evoluem com cronificação da doença (AFONSO e cols., 1993). Camundongos BALB/c, após imunização com determinados peptídeos associados a adjuvantes, tornam-se resistentes a infecção. Desde quando células tipo Th-1 produzem IFN- γ , um potente ativador macrofágico e indutor da produção de óxido nítrico, compreende-se porque mediam resistência. O papel das células Th-2, no entanto, não é claro. Em um modelo experimental de leishmaniose visceral, o parasitismo esplênico foi relacionado a expressão aumentada de RNA-m para IL-4 e IL-10 e retardada para sintetase induzível de óxido nítrico (iNOS) (MELBY e cols., 1998). IL-4 foi implicada no direcionamento da resposta imune para Th2 na leishmaniose, visto que cepas de camundongos que não resolvem a infecção apresentam expressão aumentada e sustentada de IL-4 e que, tornam-se resistentes mediante a neutralização de IL-4 com anticorpos anti-IL-4 na fase inicial da infecção (REINER & LOCKSLEY, 1995). Mas, contrariando estes dados, NOBEN-TRAUTH e cols. (1996) demonstraram que camundongos BALB/c deficientes para IL-4 permanecem suscetíveis a infecção por *L. major* e mantêm resposta tipo Th-2.

Assim como a IL-4 tem sido relacionada com o direcionamento para resposta Th-2, a IL-12 tem sido para Th-1. Um estudo *in vitro* demonstrou que a infecção de macrófagos de camundongos por formas promastigotas de *L. major*, que representam a forma infectante do parasito, leva a inibição da expressão de RNA-m para IL-12, propiciando portanto, maior sobrevivência do parasito na fase inicial da infecção (CARRERA e cols., 1996). IL-12

tem um papel importante no desenvolvimento da resposta Th1 e na citotoxicidade por células NK nos animais resistentes, visto que sua neutralização com anticorpos compromete estas respostas (SCHARTON-KERSTEN e cols., 1995). Este papel imunorregulatório da IL-12 consiste tanto na geração de células produtoras de IFN- γ quanto na supressão da produção de IL-4, indicando que sua ação ocorre tanto na fase inicial quanto na manutenção da resposta (HEINZEL e cols., 1995). Dois outros estudos confirmam estes dados: a vacinação de camundongos BALB/c com antígeno de leishmânia e IL-12 induz resistência nestes animais através da produção de INF- γ e ativação macrofágica (AFONSO e cols., 1994) e a administração de IL-12 e Pentostan durante o curso da infecção por *L. major* em BALB/c é capaz de desviar a resposta imune para um padrão tipo Th1, com conseqüente destruição dos parasitos (NABORS e cols., 1995). Entretanto, camundongos BALB/c também têm expressão aumentada de IL-12 na fase inicial da infecção, sugerindo que esta citocina sofra ação supressora das moléculas indutoras da resposta Th-2 (SCHARTON-KERSTEN e cols., 1995). Em animais resistentes, além da produção de IL-12, sua ligação com o respectivo receptor (IL-12R) também está aumentada, e este aumento se correlaciona com um aumento na expressão de RNAm para IL-12R (JONES e cols., 1998). Pelos dados acima citados, nestes modelos murinos, ainda não é bem definido quais citocinas seriam responsáveis pelo direcionamento da resposta imune para um padrão Th1 ou Th2. Uma hipótese para a explicação deste direcionamento inicial é o processamento e a apresentação do antígeno de forma defeituosa com ação inadequada de moléculas coestimulatórias como B7 e CD40 (SAHA e cols., 1995). Células acessórias dos linfonodos de camundongos BALB/c apresentam menor densidade de CD40 comparadas com células de camundongos C57BL/6 e o bloqueio de CD40 diminui a expressão de IL-12 nos animais resistentes (HEINZEL e cols., 1998).

1.4 Papel da IL-12 na imunorregulação

A IL-12 foi descoberta em 1989 e têm sido relacionada com várias formas de resposta do sistema imune: aumento da atividade de células T citotóxicas e de células NK, regulação da produção de IFN- γ e diferenciação de células T auxiliaadoras CD4⁺ tipo Th1. A IL-12 é produzida por células fagocíticas e por linfócitos B em resposta a infecções bacterianas e por parasitos intrwacelulares, representando, portanto, uma ligação entre a resposta imune inata e adquirida. É um heterodímero (p70) formado por duas cadeias polipeptídicas, p35 e p40 (TRINCHIERI & SCOTT, 1994). RNA-m do gene p35 é constitutivamente expresso porém a secreção da proteína é detectável apenas quando associada a cadeia p40. A expressão de p40 é restrita a células que produzem IL-12 e é secretada em excesso em relação a proteína ativa com uma proporção que varia de 10:1 a 50:1 (TRINCHIERI, 1995). A produção de IL-12 por macrófagos pode ser induzida pela interação com células T ativadas via sinais coestimulatórios como CD40 ligante (LAMONT & ADORINI, 1996). A subunidade p40 possui os determinantes estruturais necessários para a ligação da IL-12 ao seu receptor. Esta hipótese foi sugerida pelo fato da p40 murina formar um homodímero capaz de se ligar ao receptor de IL-12 (IL-12R), podendo constituir um antagonista desta citocina (GILLESSEN e cols., 1995). Confirmando este dado, foi demonstrado que homodímeros p40 se ligam ao IL-12R1, um receptor de alta afinidade, ao passo que regiões específicas da proteína heterodimérica ligam-se ao receptor de baixa afinidade IL-12R2 (PRESKY e cols., 1998). *In vivo*, este homodímero foi detectado em camundongos estimulados com LPS ou infectados com BCG, mostrando-se capaz de reduzir a produção de IFN- γ dependente de IL-12 (HEINZEL e cols., 1997). Um outro estudo, usando um modelo murino, a IL-12p40 levou a proteção contra rejeição de enxerto através da inibição de produção de IFN- γ e IL-2 (KATO e cols., 1996).

Camundongos transgênicos, capazes de produzir grande quantidade de homodímeros de IL-12 p40, produzem quantidades diminuídas de IFN- γ e aumentadas de IL-4 e IL-10 após estímulo antigênico, e são susceptíveis a infecção pelo patógeno intracelular *Plasmodium berghei* (YOSHIMOTO e cols., 1998). Além disto, p40 livre é encontrada em grande quantidade no líquido peritoneal de mulheres com endometriose, sendo capaz de inibir *in vitro* a resposta citotóxica de células NK contra as células endometriais, o que indica seu papel como antagonista da IL-12 também em patologias humanas (MAZZEO e cols., 1998). Na infecção pelo HIV a IL-12 é capaz de restaurar *in vitro* a resposta específica a antígenos caracterizada por produção de IFN- γ e linfoproliferação (CLERICI e cols., 1993). Esta citocina tem um papel importante na infecção pela leishmânia, como já foi citado nas seções anteriores.

1.5 Papel da IL-15 na imunorregulação

A IL-15 foi isolada e clonada de uma linhagem de células epiteliais (CV-1/EBNA) através de sua capacidade de promover proliferação de linfócitos T citotóxicos de uma linhagem dependente de IL-2 denominada CTLL-2. A IL-15 liga-se às subunidades β e γ do receptor de IL-2 (IL-2R), apesar de não ter nenhuma homologia de sequência de aminoácidos com esta. As principais fontes de IL-15 são monócitos, mas, RNA-m para IL-15 também é expresso na placenta, músculo esquelético, pulmão, fígado e rim. Não é produzida por linfócitos T ou B (GRABSTEIN e cols., 1994). Sua expressão é induzida por IFN- γ e potencializada por LPS, e organismos intracelulares como BCG e *Toxoplasma gondii*. Sua produção sofre regulação negativa de, fraca intensidade de IL-4, IL-13 e TGF- β , que caracteristicamente são inibidores da resposta imune tipo Th1. IL-10, que é

um inibidor de outras citocinas como IL-2 e IL-12, aumenta a expressão de IL-15 (DOHERTY e cols., 1996). Como IL-2, a IL-15 é capaz também de induzir proliferação em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. No caso das células CD8⁺, ocorre ativação de células de memória e “naïve”, ao passo que apenas as células de memória CD4⁺ são ativadas por IL-15 ou IL-2 (KANEGANE & TOSATO, 1996). A IL-2 associada a IL-4 induz a produção de IL-4 por células CD4⁺ “naïve”, direcionando portanto, para uma resposta tipo Th2, porém, a IL-15 não tem este papel. Por outro lado, em doses elevadas, IL-15, de forma semelhante a IL-2, é capaz de direcionar células CD4 para produzir IFN- γ , mas esta não parece representar uma resposta fisiológica da IL-15 (SEDER e cols., 1996). A IL-15, assim como a IL-4 e IL-7, que são citocinas que ligam-se ao IL-2R γ , age sinergicamente com a IL-12 para geração de resposta citotóxica (ABDI e cols., 1997). A coestimulação de IL-12 e IL-15 é capaz de induzir proliferação de células NK com produção de níveis elevados de IFN- γ (WARREM e cols., 1996) e também induz a produção, por células NK, de MIP-1 α , que é um potencializador da ativação macrofágica induzida por IFN- γ (BLUMAN e cols., 1996). Estes dados sugerem que citocinas derivadas de macrófagos, como IL-12 e IL-15, são importantes na iniciação da proliferação de células NK durante a resposta imune inata, principalmente contra organismos intracelulares onde é necessária a produção de IFN- γ e a consequente ativação macrofágica. As células NK são derivadas da medula óssea e a IL-15, provavelmente produzida por células estromais da medula óssea, induz células progenitoras CD34⁺ a se diferenciarem em células NK produtoras de IFN- γ em fase precoce de diferenciação, confirmando que esta citocina é importante na fase inicial da resposta imune (MROZEK e cols., 1996). Além da proliferação e indução de produção de citocinas pelas células citotóxicas, a IL-15 também aumenta suas atividades funcionais através do aumento de produção de perforinas, granzimas A e B, e FAS ligante,

que são mediadores citolíticos presentes nos grânulos citoplasmáticos ou na superfície dos linfócitos (YE e cols., 1996). Apesar das citocinas imunossupressoras não terem efeito direto sobre a expressão da IL-15 nos monócitos, elas são capazes de antagonizar seus efeitos funcionais sobre as células NK. A IL-4 pode antagonizar os efeitos da IL-15, mas não da IL-12, sobre as células NK através da diminuição da expressão do receptor para IL-2 (SALVUCCI e cols., 1996). TGF- β , que também é produzido por monócitos, é um potente inibidor da produção de IFN- γ por células NK estimuladas tanto por IL-12 quanto por IL-15. A IL-10 não tem este mesmo efeito (CARSON & CALIGIURI, 1996).

Vários estudos demonstraram que a IL-15 pode ser uma proteína importante na ativação de células fagocíticas e não fagocíticas envolvidas na defesa contra microorganismos intracelulares. Em um modelo experimental de infecção por *Salmonella*, a IL-15 contribui para a ativação de células T $\gamma\delta$, que têm um papel protetor na fase inicial da doença (NISHIMURA e cols., 1996). Monócitos humanos tratados com IL-15 e estimulados com *Candida albicans* apresentam uma produção aumentada de superóxido, ou seja, ocorre uma potencialização funcional de um mecanismo antimicrobiano (VASQUEZ e cols., 1998). Na infecção in vitro de CMSP por herpes-virus a IL-15 é a principal responsável pela ativação de células NK, responsáveis pelo controle da infecção (ATEDZOE e cols., 1996). A hanseníase, assim como a leishmaniose, é uma doença espectral, apresentando um polo não responsivo chamado virchowiano, caracterizado por resposta imune tipo Th2 e um outro polo, chamado tuberculóide, que apresenta resposta tipo Th1. Nas lesões cutâneas da hanseníase tuberculóide há maior expressão de IL-15 do que na forma virchowiana, e a IL-15 é capaz de restaurar a resposta imune específica, medida através de proliferação, contra *M. leprae* na forma virchowiana, com proliferação principalmente da subpopulação de células CD56⁺ (células NK) (JULLIEN e cols., 1997). Em estudos *in vitro* com células de indivíduos infectados pelo HIV, a IL-15 parece restaurar deficiências

imunes funcionais. Houve proliferação aumentada em CMSP e células CD4⁺ estimuladas com antígenos conhecidos e tratadas com IL-15, porém, apenas com doses elevadas ocorre produção de IFN- γ , e como a presença de anti-IL-15 no meio de cultura reduz a produção de IFN- γ parece haver papel da IL-15 produzida endogenamente (SEDER e cols., 1995). A citotoxicidade celular dependente de anticorpo e por células NK é aumentada na presença de IL-15 em CMSP de indivíduos HIV positivos (LOUBEAU e cols., 1997). Além disto, a IL-15 produzida por macrófagos alveolares parece ter um papel na proliferação, ativação e acúmulo de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ no pulmão de pacientes com AIDS (AGOSTINI e cols., 1997). Os níveis séricos de IL-15 em indivíduos infectados pelo HIV se correlacionam com o estágio da doença e, positivamente, com os níveis de imunoglobulinas (KACANI e cols., 1997). Como a IL-15 estimula a proliferação e a produção de imunoglobulinas por linfócitos B (ARMITAGE e cols., 1995), esta citocina pode ter um papel importante na disfunção desta subpopulação de linfócitos e a consequente hipergaglobulinemia na AIDS. Do ponto de vista terapêutico, a IL-15 demonstrou ser menos tóxica que a IL-2 e mais potente na geração de células citotóxicas, tendo sido utilizada como tratamento isolado e adjuvante em modelos murinos experimentais de tumores malignos (MUNGER e cols., 1995; EVANS e cols., 1997).

2 OBJETIVO PRINCIPAL

- Investigar o papel da IL-15 e da IL-12, na resposta imune contra a leishmânia. A nossa hipótese é que a IL-15, cujos mecanismos de ação incluem fases efetoras da resposta imune celular, tenha um papel na imunomodulação da leishmaniose. Entre estes mecanismos incluímos a proliferação e diferenciação linfocitária e a resposta citotóxica. No pólo não responsivo (LVA e LCD) caracterizar a capacidade destas citocinas de restaurar a resposta imune avaliando o possível sinergismo entre elas, visto que em estudos anteriores, foi observado que a restauração da resposta imune com o uso de mAbs anti-IL-4, anti-IL-10 ou com IL-12 não ocorreu em todos os pacientes. No pólo hiperresponsivo (LCM), através do bloqueio destas citocinas com anticorpos monoclonais, verificar se ocorrerá reversão da resposta conhecida.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Através de ensaios de proliferação, de produção de IFN- γ e citotoxicidade avaliar o papel da IL-12 e da IL-12+IL-15 em cultivos de CMSP de pacientes com LVA e LCD.
2. Avaliar o papel de anti-IL-12 e de anti-IL-15 na regulação da proliferação, produção de IFN- γ e citotoxicidade na LCM.
3. Comparar a concentração sérica da IL-12 p40 nas diferentes formas de leishmaniose humana.

3 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma doença com espectro que vai desde o polo não responsivo, representado pela leishmaniose visceral e pela leishmaniose cutânea difusa, até o polo hiperresponsivo da leishmaniose mucosa, além de formas subpolares. Microorganismos do mesmo gênero levam a diversas formas clínicas de doença que estão relacionadas com a resposta imune do hospedeiro. O estudo destes padrões de resposta imune através de modelos experimentais assim como manipulações *in vitro* através de cultivos celulares, analisando a resposta imune celular, tem permitido caracterizar os mecanismos envolvidos nestas diferentes doenças.

IL-2 e IFN- γ são importantes na resposta protetora contra a leishmânia. A IL-15, além de utilizar o mesmo receptor que a IL-2, tem ações semelhantes a esta, como a indução de proliferação de células T e produção de IFN- γ que fazem parte de uma resposta eficiente contra a leishmânia. Organismos intracelulares, como a leishmânia, são inicialmente fagocitados por macrófagos no sítio da infecção e citocinas derivadas de macrófagos, como a IL-15, podem ter um papel importante tanto na resposta imune inata quanto na adquirida, incluindo células NK e células T CD8⁺.

O papel da IL-12 já foi estudado nesta doença inclusive tendo sido demonstrado sua ação adjuvante na terapêutica e na produção de vacinas (MURRAY e cols., 1995; AFONSO e cols. 1994).

Não existe dados na literatura, até o momento, sobre o possível papel da IL-15 na leishmaniose, sendo importante determinar se esta citocina pode ter influência nas formas não responsivas da doença, assim como verificar sua participação nas formas hiperresponsivas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pacientes e controles

Foram incluídos:

- Dezenove pacientes com leishmaniose visceral provenientes dos hospitais Professor Edgard Santos, Couto Maia e Cleriston Andrade (Feira de Santana). O diagnóstico foi feito através da identificação de formas amastigotas de leishmânia no esfregaço do aspirado de medula óssea corado com Giemsa ou através de sorologia utilizando imunofluorescência indireta para leishmânia. Todos os pacientes foram avaliados antes do início da terapêutica específica (Quadro 1)
- Dezoito pacientes com leishmaniose mucosa provenientes de Corte de Pedra, Bahia. O diagnóstico foi firmado baseado no quadro clínico, testes sorológicos e teste cutâneo positivo (reação de Montenegro). Todos os pacientes tinham doença ativa no momento da avaliação (Quadro 2).
- Três pacientes com leishmaniose difusa provenientes de São Luis, Maranhão, diagnosticados através do quadro clínico, teste cutâneo negativo e cultura da biópsia de pele positiva (Quadro 3).

A coleta de sangue foi realizada com consentimento pós-informação.

- Quatorze doadores voluntários sadios do próprio laboratório
- Para análise de IL-12 p40 foram utilizados soros estocados no laboratório a -20°C que incluíram: 15 pacientes com leishmaniose visceral na fase aguda, nove destes foram testados pré e pós tratamento, 10 pacientes com LTA e 15 indivíduos de área endêmica com sorologia negativa para leishmaniose.

Quadro 1. Pacientes com leishmaniose visceral.

Número	Idade	Sexo	Mielograma	Sorologia
1	18a	F	NR	1:1024
2	25a	F	positivo	1:256
3	27a	M	positivo	NR
4	18a	M	positivo	NR
5	20a	M	positivo	1:1024
6	30a	M	positivo	NR
7	20a	M	positivo	NR
8	14a	F	positivo	NR
9	36a	M	negativo	1:128
10	45a	M	NR	1:1024
11	19a	F	NR	1:320
12	15a	M	negativo	1:320
13	16a	M	NR	1:1024
14	30a	M	positivo	NR
15	32a	M	positivo	NR
16	50a	M	positivo	1:1024
17	18a	M	positivo	1:1024
18	13a	M	positivo	NR
19	17a	M	negativo	1:1024

NR= não realizado.

Quadro 2. Pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa.

Número	Sexo	R. de Montenegro	Sorologia
1	M	27x25	1/32
2	M	11x12	1/64
3	F	13x15	1/16
4	M	17x11	1/128
5	M	25x15	1/256
6	M	6x5	1/128
7	M	23x20	1/64
8	M	20x18	1/16
9	M	20x19	1/1024
10	M	12x9	1/64
11	M	15x15	1/16
12	M	30x33	1/64
13	M	20x17	1/16
14	M	17x12	1/32
15	M	20x20	1/64
16	M	10x10	1/64
17	M	25x30	1/64
18	M	15x14	1/128

Quadro 3. Pacientes com leishmaniose cutânea difusa.

Número	Idade	Sexo	Nº de lesões	Cultura para leishmânia	R. de Montenegro
1	13a	F	várias	positiva	negativo
2	16a	F	várias	positiva	negativo
3	27a	M	86	positiva	negativo

4.2 Reagentes

- IL-12 humana recombinante (Genetics Institute, Cambridge, MA, EUA, lote 4D18/0002), usada na dose 5 e 10 ng/ml.
- IL-15 humana recombinante (Genzyme Institute, Cambridge, MA, EUA, lote 80-3696-01) usada entre 1 e 10 ng/ml.
- Anti-IL-12 humana (Genetics Institute, lote L 3043) usado na dose 5 e 10 µg/ml.
- Anti-IL-15 humana (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA, lote QK 035111) usado na dose 5 e 10 µg/ml.
- IgG anti-mioglobina humana (Cappel Laboratories, Cochranville, PA, USA, lote 11193B), usada como isotipo controle nos ensaios de neutralização.
- Kit DuoSeT Human IFN- γ , (Genzyme).
- Kit QuantikineTM, human IL-12p40, (R&D Systems).

4.3 Preparo do antígeno de leishmânia

Preparação do antígeno:

Parasitas da cepa MHOMBR88-Ba-125 de *L. amazonensis* e da cepa MHOMBR-Ba-03 de *L. donovani* foram cultivados em meio LIT modificado, suplementado com soro bovino fetal (SBF) (Hyclone Laboratories, Logan, UT, EUA) a 10%. Foram centrifugadas (1000

x g por 15') formas promastigotas, obtidas na fase estacionária do crescimento, e submetidas a 10 ciclos de congelamento e descongelamento. Não restando promastigotas íntegros, esta suspensão foi centrifugada (10000 x g por 30') e o sobrenadante obtido foi filtrado. O conteúdo protéico foi determinado pelo método Lowry.

O antígeno de *Leishmania donovani* foi utilizado nos experimentos com CMSP de pacientes com LVA, na concentração de 10 µg/ml. O antígeno de *Leishmania amazonensis* foi utilizado nos ensaios com CMSP de pacientes com LTA na concentração de 5 µg/ml. Estas concentrações foram definidas previamente no laboratório, como as mínimas necessárias para induzir resposta proliferativa em pacientes tratados para LVA e em pacientes com LTA.

4.4 Separação de CMSP

Foram coletados de 20 a 25 ml de sangue total heparinizado na proporção 10 UI/ml, diluídos em partes iguais com solução salina. CMSP foram separadas através de gradiente de Fycoll- Hypaque (Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, EUA), lavadas três vezes com solução salina, resuspensas em RPMI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) complementado com 10% de soro AB inativado, 1% de glutamina (Sigma Chemical Co.) e 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma Chemical Co.) e ajustadas de acordo com cada experimento.

4.5 Ensaio de linfoproliferação

CMSP foram ajustadas para a concentração de 1×10^6 células/ml e cultivadas em triplicatas em placas de 96 poços com fundo plano, 200 μ l/poço, por 5 dias, a 37°C com CO₂ a 5% na presença de antígeno de leishmânia, citocinas e anticorpos monoclonais nas concentrações supra-citadas. Como controle positivo de proliferação CMSP foram estimuladas com mitógeno do pokeweed (PWM) (Life Technologies GIBCO BRL, Grand Island, NY, EUA) 1:100 da concentração da solução estoque. Após cinco dias, as células foram pulsadas com 1 μ Ci de timidina [³H] (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, EUA) nas últimas 14 a 16 horas de cultura e o nível de incorporação foi medido através da cintilação líquida. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) da cpm (contagem por minuto) das culturas triplicadas ou como índice de estimulação (IE), calculado dividindo a cpm da cultura estimulada pela cpm da não estimulada.

4.6 Ensaio de citotoxicidade

Obtenção das células efectoras:

CMSP foram ajustadas para a concentração de 3×10^6 células/ml e cultivadas em placas de 24 poços, 1 ml/poço, por seis dias, a 37°C com CO₂ a 5% na presença de antígeno de leishmânia, citocinas ou anticorpos monoclonais. Após seis dias, as CMSP foram coletadas dos poços, contadas, resuspensas em RPMI suplementado com SBF a 10% na concentração de 2×10^6 células/ml e utilizadas como células efectoras.

Obtenção das células alvo:

Células de linhagem tumoral K562 foram preparadas a partir de culturas em suspensão e utilizadas como células alvo. Ajustadas para 10^7 células/ml, incubadas com $200 \mu\text{Ci/ml}$ de [^{51}Cr] por 90 minutos, lavadas 3 vezes com RPMI e resuspensas em RPMI suplementado com SBF a 10% na concentração de 4×10^4 células/ml.

Ensaio de citotoxicidade:

Aliquotas de 2×10^3 células alvo ($50 \mu\text{l}$) foram incubadas com células efectoras com relação efector:alvo entre 12,5:1 e 100:1 em placas de microtitulação com fundo redondo por 4 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Liberação espontânea foi obtida por células alvo na presença de meio apenas e liberação máxima na presença de HCL 0,1M e Triton-X 10%. Sobrenadantes foram coletados (Skatron Harvesting System, Noruega) e a radioatividade foi medida em um contador gama (modelo 5500; Beckmann, Fullerton, CA). O percentual de lise foi calculado usando a seguinte fórmula: $100 \times [(\text{liberação experimental} - \text{liberação espontânea}) / (\text{liberação máxima} - \text{liberação espontânea})]$ com médias de poços duplicados.

4.7 Determinação do nível de $\text{IFN-}\gamma$

Coleta do sobrenadante:

CMSP foram ajustadas para a concentração de 3×10^6 células/ml e cultivadas em placas de 24 poços, 1 ml/poço, a 37°C com CO_2 a 5% na presença de antígeno de leishmânia, citocinas ou anticorpos monoclonais por seis dias. Após centrifugação por 10 minutos a

1500 rpm, 900 µl de sobrenadante foi coletado de cada poço, e congelado a -20°C até a realização do ELISA.

ELISA:

Placas Imulon foram sensibilizadas com 100µl/poço do anticorpo de captura (anti-IFN-γ humano) e incubado a 4°C overnight. Feito o bloqueio com 250µl/poço de albumina sérica bovina a 4% por 2 horas a 37°C. Foram colocados 100 µl/poço do padrão (IFN-γ) ou de cada amostra do sobrenadante, sem diluir, e incubados por 1 hora a 37°C. O segundo anticorpo (anti-IFN-γ conjugado a peroxidase) foi colocado na concentração de 2µg/ml por 30 minutos a 37°C. A revelação foi feita com o substrato tetra metil benzidina (TMB), 100µl/poço por 30 minutos a temperatura ambiente e a leitura da densidade ótica feita a 450 nm dentro de 60 minutos.

4.8 Determinação do nível de IL-12 p40 no soro

Em de placa de microtitulação, previamente sensibilizada com anticorpo monoclonal murino contra IL-12 p40, foram colocados 100µl/poço do padrão (IL-12p40) ou de cada amostra e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Foram acrescentados 200 µl/poço do segundo anticorpo (ac. policlonal contra IL-12 p40 congugado com peroxidase) e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Após revelação com 200µl/poço do substrato (TMB), por 30 minutos a temperatura ambiente, foi feita a leitura da densidade ótica a 450nm .

4.9 Análise estatística

Comparações do efeito das citocinas ou dos anticorpos monoclonais neutralizantes na resposta proliferativa, produção de IFN- γ ou resposta citotóxica e a diferença na concentração de IL-12 p40 no soro de pacientes antes e após o tratamento foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. Comparação entre os grupos de pacientes e grupos controles foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. Os cálculos foram realizados no programa Graphpad.

5 RESULTADOS

5.1. Ação de IL-15 e de IL-12+ IL-15 na LVA

5.1.1. Estudo de dose resposta de IL-15 na LVA e em controles normais.

Com a finalidade de avaliar a dose ótima de IL-15 na linfoproliferação foram utilizadas CMSP de 17 pacientes com LVA e oito controles normais. As concentrações de IL-15 testadas foram 1, 2,5, 5 e 10 ng/ml na presença e na ausência de antígeno de leishmânia na concentração de 10 μ g/ml. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as respostas de pacientes com LVA e controles normais (Figura 1).

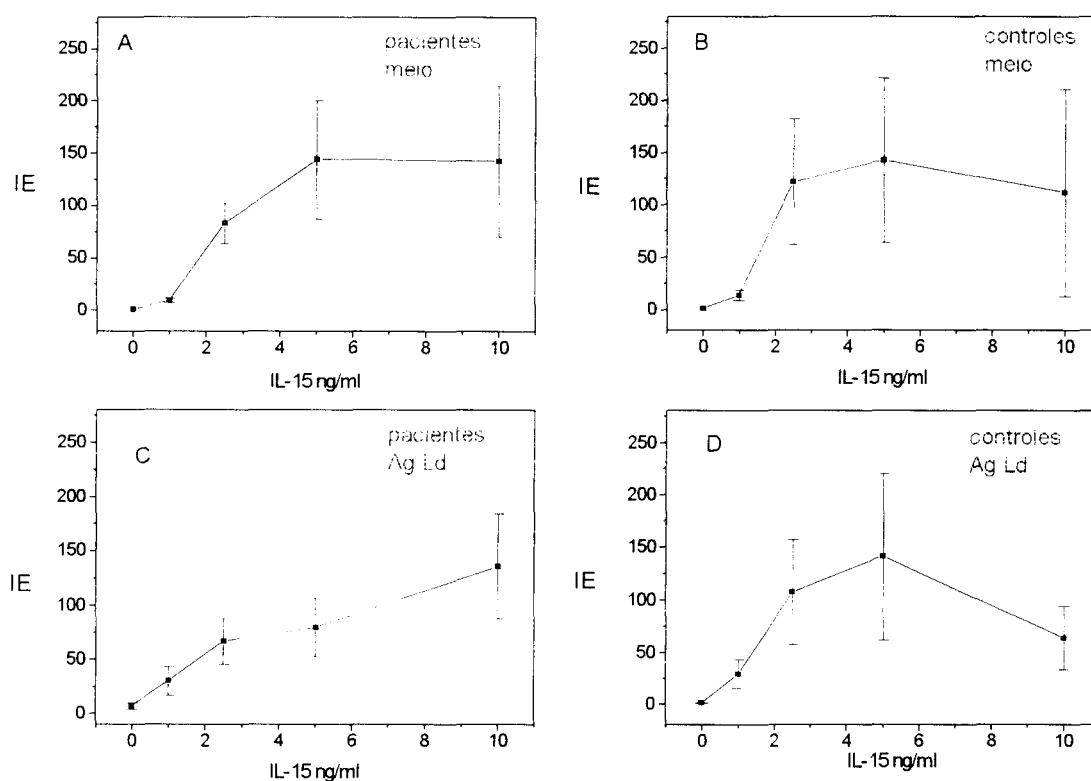


Figura 1. Efeito da IL-15 na linfoproliferação. CMSP de 17 pacientes com LVA e 8 controles normais foram cultivadas por 5 dias na presença de diferentes concentrações de IL-15 apenas ou estimuladas com antígeno de *L. donovani* (Ag Ld), 10 μ g/ml, e foi medida a incorporação de [³H] timidina. Os resultados são apresentados como média e erro padrão do índice de estimulação (IE).

Comparando culturas na presença de 1 ng/ml de IL-15 com culturas não estimuladas a diferença foi estatisticamente significante com $p=0,0003$. Nas demais doses, nos pacientes com LVA e nos controles houve uma correlação entre a dose e a resposta atingindo um platô entre 5 e 10 ng/ml . Em culturas de células de pacientes estimuladas com antígeno de *Leishmania donovani*, a presença de IL-15 na dose de 1 ng/ml, levou a um aumento da média \pm DP do índice de estimulação de $9,0\pm 7$ para 30 ± 52 , com $p=0,002$. Porém, quando comparamos o grupo estimulado apenas com IL-15 (1ng/ml) com o estimulado com IL-15 e antígeno, não houve diferença estatisticamente significante, com $p=0,1$. Com doses mais elevadas de IL-15 também não ocorreu aumento da resposta proliferativa específica a antígeno de leishmânia (Figura 1). Os resultados são mostrados em cpm nas tabelas apêndice A e B.

5.1.2 Ação de IL-12 e de IL-15 na linfoproliferação

Não houve diferença entre IL-15 isoladamente e IL-15+IL-12 cujas médias \pm DP dos resultados do índice de estimulação foram respectivamente 30 ± 53 e $31,3\pm 45$ (Figura 2). Os dados também são mostrados em cpm na tabela apêndice A.

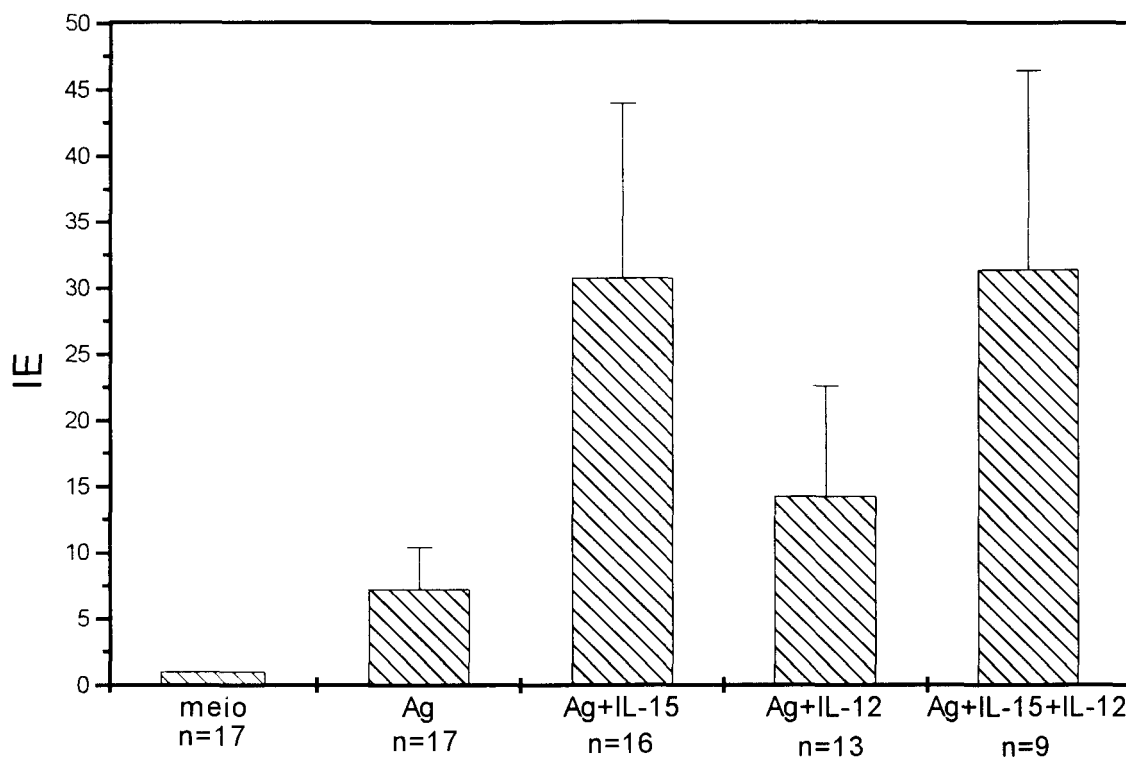


Figura 2. Linfoproliferação em pacientes com LVA. CMSP de pacientes foram estimuladas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno de *L. donovani* na presença de 1ng/ml de IL-15 ou 1ng/ml de IL-15 + 5 ng/ml de IL-12. Após 5 dias de cultura foi medida a incorporação de [^3H] timidina. Resultados são mostrados como média e erro padrão do índice de estimulação.

5.1.3. Ação de IL-15 e de IL-12+IL-15 na produção de IFN- γ

CMSP de cinco pacientes com LVA e cinco controles normais foram cultivadas com 5 ng/ml de IL-12 e/ou 5ng/ml de IL-15 na presença ou não de antígeno de *L. chagasi* por seis dias e a concentração de IFN- γ foi dosada no sobrenadantes. Os resultados são mostrados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Concentração de IFN- γ (pg/ml) em SBN de cultura de CMSP de pacientes com LVA.

	<i>Paciente1</i>	<i>Paciente7</i>	<i>Paciente9</i>	<i>Paciente10</i>	<i>Paciente16</i>
meio	0	8.8	24	5	3
Ag	0	8.8	252	52	28
IL-12	NR	NR	668	NR	49
Ag+IL-12	13	324	939	NR	204
IL-15	0	18	223	2.5	16
Ag+IL-15	0	0	358	104	51
Ag+IL-12+IL-15	NR	132	1150	1047	NR
PWM	2392	1183	NR	NR	NR

NR= não realizado

Tabela 2. Concentração de IFN- γ (pg/ml) em SBN de cultura de CMSP controles normais.

	<i>Controle1</i>	<i>Controle2</i>	<i>Controle3</i>	<i>Controle 4</i>	<i>Controle5</i>
meio	0	3.9	5	6	0
Ag	0	28	6.7	280	900
IL-12	NR	NR	NR	20	10
Ag+IL-12	38	1869	NR	2200	2500
IL-15	0	77	0	113	0
Ag+IL-15	0	8.8	41	750	417
Ag+IL-12+IL-15	0	1978	867	NR	NR
PWM	2338	1356	NR	NR	NR

NR= não realizado

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença ou não de IL-15 em culturas estimuladas com antígeno de leishmânia ($p=0,17$). A IL-12, em três dos quatro pacientes testados foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ por CMSP estimuladas com antígeno de leishmânia, mas este resultado não foi estatisticamente significativo ($p=0,12$). Três dos quatro controles normais também apresentaram aumento de produção de IFN- γ na presença de IL-12 combinada com antígeno.

A IL-15, na concentração de 5 ng/ml, levou a uma proliferação inespecífica, como demonstrado nos resultados anteriores, mas não induziu aumento na produção de IFN- γ .

5.1.4. Ação de IL-12 e de IL-12+IL-15 na resposta citotóxica

Foi avaliada a resposta citotóxica antitumoral em sete pacientes com LVA. Na Figura 3 observa-se aumento da citotoxicidade após estimulação com antígeno de *L. donovani* em três dos oito pacientes testados, porém este aumento não foi estatisticamente significativo com $p=0,31$.

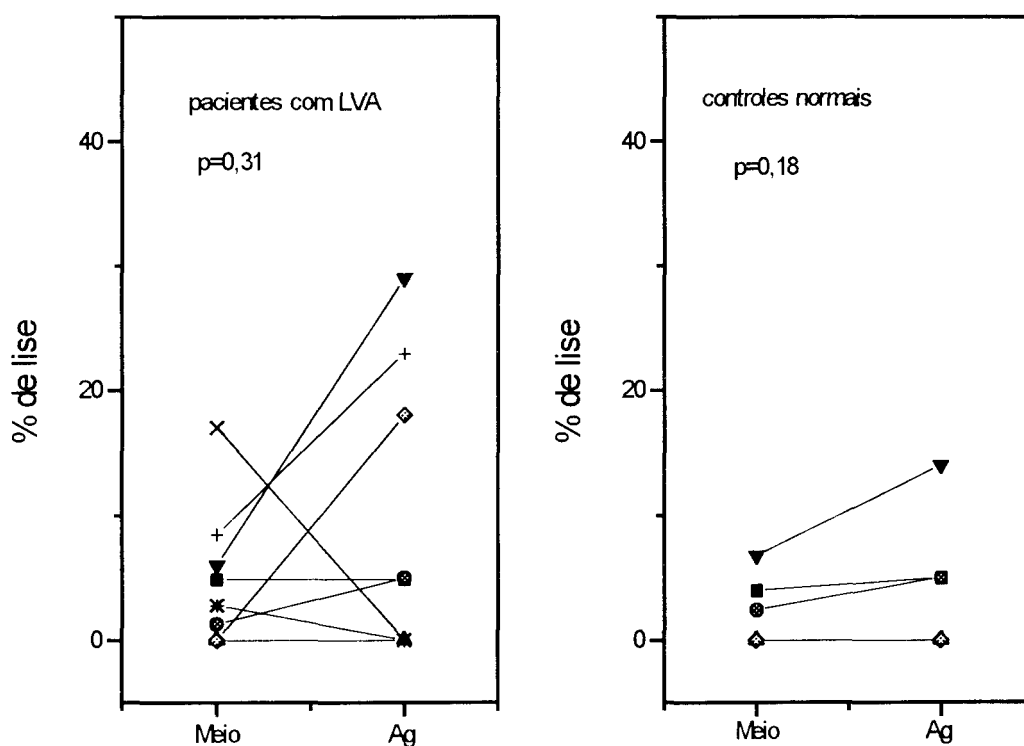


Figura 3. Citotoxicidade em pacientes com LVA. CMSP foram separadas e cultivadas por 5 dias, estimuladas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno de *L. donovani* (Ag) e incubadas com células tumorais K562 (células alvo) radiomarcadas com ^{51}Cr na proporção 100:1. Os resultados são expressos em % de lise específica.

Nos cinco controles normais também não houve diferença após estimulação com antígeno ($p=0,18$). Com o objetivo de avaliar a ação da IL-15 e da IL-12 no aumento desta resposta, as células efectoras foram estimuladas também na presença destas citocinas. Comparando com meio apenas, a IL-15 elevou a média do percentual de lise específica de 5 para 73%, com $p=0,12$. Em CMSP estimuladas com antígeno de leishmânia este aumento foi de 9,9 para 63%, com $p=0,007$ (Figura 4, A e B). A IL-12 também induziu a resposta citotóxica, porém em menor intensidade ($p=0,03$) (Figura 4, C). A presença de IL-15 e IL-12 em CMSP estimuladas com antígeno levou a um aumento menos intenso com resultado não estatisticamente significativo ($p=0,06$) e quando comparado ao grupo estimulado com antígeno e IL-15 apenas, apesar de haver uma diminuição da resposta em quatro dos sete pacientes testados, também não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,21$) (Figura 4, B e D).

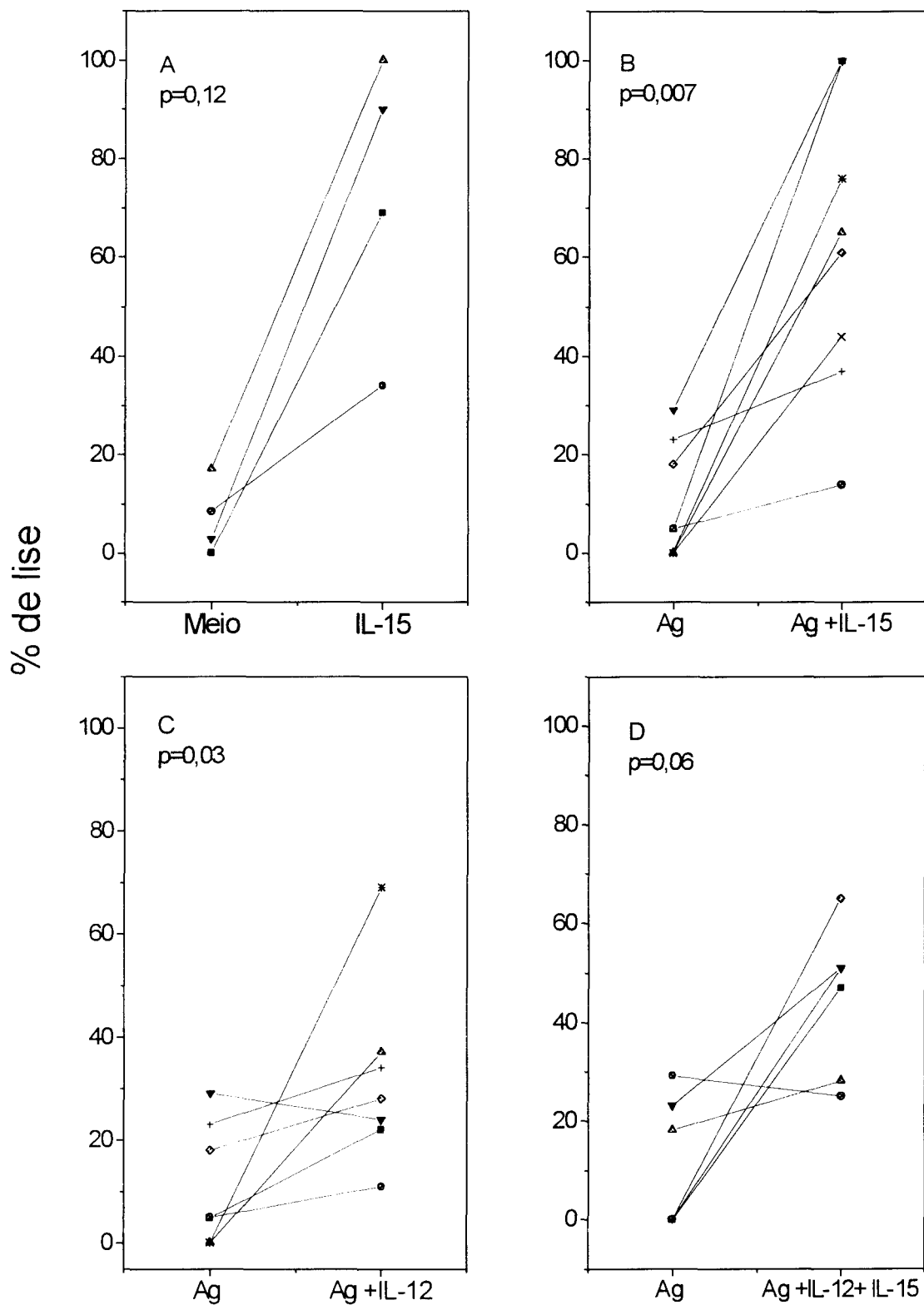


Figura 4. Efeito da IL-12 e da IL-15 na citotoxicidade em pacientes com LVA. CMSP foram separadas e cultivadas por 5 dias, estimuladas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno de *L. donovani* (Ag) na presença ou não de IL-12 (5ng/ml) e/ou de IL-15 (5 ng/ml) e incubadas com células tumorais K562 (células alvo) radiomarcadas com ^{51}Cr na proporção 100:1. Os resultados são expressos em % de lise específica.

5.2. Ação de IL-15 de IL-12+ IL-15 na LCD

CMSP de três pacientes com LCD foram estimuladas com antígeno de leishmânia na presença ou não de IL-12 ou IL-15 com o objetivo de verificar a capacidade destas citocinas de aumentar a resposta imune celular e citotóxica. Um dos pacientes apresentou aumento na linfoproliferação na presença de apenas 1 ng/ml de IL-15 com IE=3,3. Em outro paciente, a presença de IL-12 induziu a resposta ao antígeno de leishmânia (resposta três vezes maior que na presença de antígeno apenas) (Figura 5).

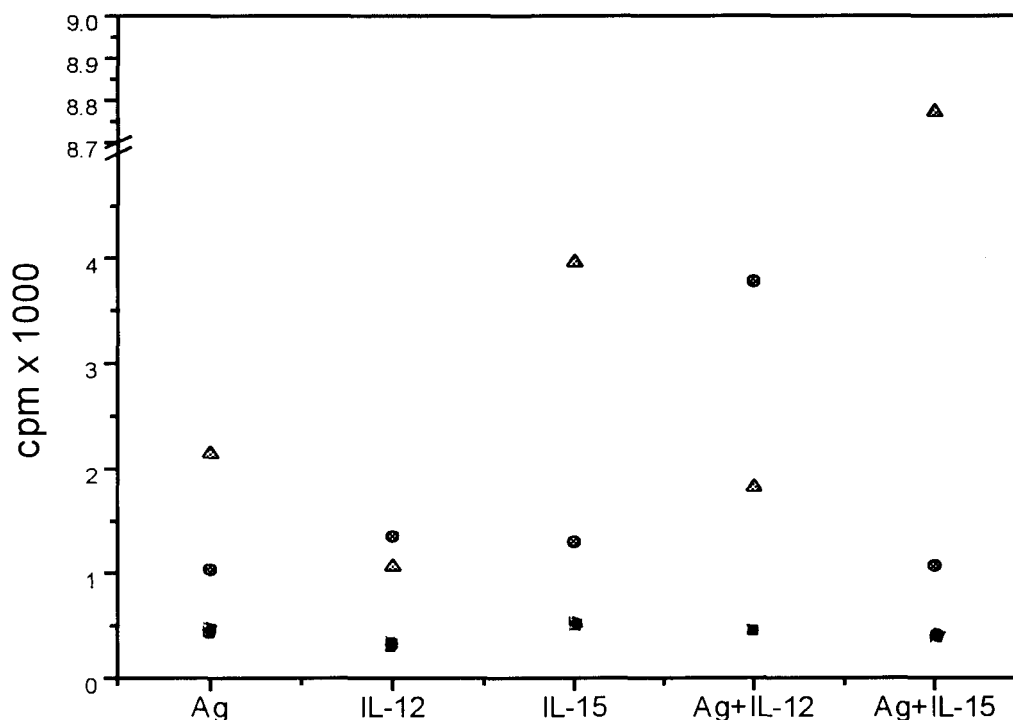


Figura 5. Efeito de IL-15 e de IL-12 na linfoproliferação de pacientes com LCD. CMSP de 3 pacientes com LCD foram cultivadas por 5 dias na presença de IL-12 (5ng/ml) ou de IL-15 (1 ng/ml), estimuladas ou não com antígeno de *L. amazonensis* e foi medida a incorporação de [³H] timidina. Os resultados são apresentados em cpm.

Os resultados da produção de IFN- γ por CMSP dos três pacientes são apresentados na tabela 3. Em dois dos três pacientes testados, após adição de IL-12, houve aumento da produção de IFN- γ por CMSP estimuladas com antígeno de *Leishmania amazonensis* de 8,8 e 0 para 1272 e 1371 respectivamente. Em nenhum dos pacientes, a presença de IL-15 levou a um aumento na produção de IFN- γ .

Tabela 3. Concentração de IFN- γ (pg/ml) em sobrenadantes de culturas de CMSP de pacientes com LCD.

	<i>Paciente1</i>	<i>Paciente2</i>	<i>Paciente3</i>
meio	97	63	0
Ag	0	8.8	181
IL-12	NR	NR	58
Ag+IL-12	1371	1272	65
IL-15	48	3.9	93
Ag+IL-15	8.8	33.5	104
Ag+IL-12+IL-15	1869	1790	99

NR=não realizado

Em dois pacientes com LCD analisamos a capacidade da IL-15 de induzir citotoxicidade contra células K562. Houve aumento na resposta tanto na presença de IL-15 quanto na de IL-12, sendo mais potente na primeira. Os resultados são expressos em percentual de lise específica na tabela 4.

Tabela 4. Citotoxicidade (% de lise específica) em pacientes com LCD.

	<i>Paciente1</i>	<i>Paciente2</i>
meio	0	3.6
Ag	4.5	27
Ag+IL-12	14	36
IL-15	54	74
Ag+IL-15	46	65
Ag+IL-12+IL-15	44	69

5.3. Ação de anticorpos monoclonais anti-IL-12 e anti-IL-15 na LCM

5.3.1 Inibição da IL-15

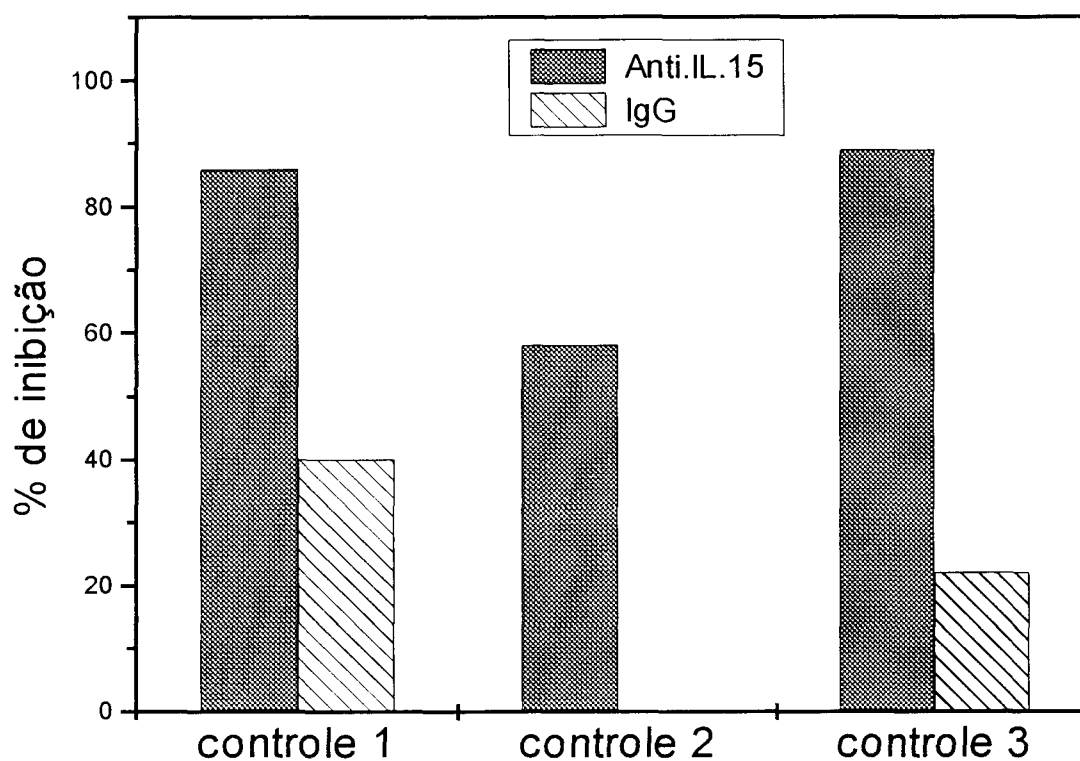


Figura 6. Inibição da ação da IL-15 por anti-IL-15. CMSP de 3 controles normais foram estimuladas com 10ng/ml de IL-15 na presença de 10 μ g/ml de anti-IL-15 ou de IgG isotipo irrelevante. Resultados são expressos em % de inibição do índice de estimulação.

Com o objetivo de testar a capacidade da anti-IL-15 inibir a ação da IL-15 cultivamos CMSP de três doadores normais estimuladas com 10 ng/ml de IL-15 na presença de 10 μ g/ml de anti-IL-15 ou de anticorpo antimióglobina do mesmo isotipo.

A Figura 6 mostra que nos três controles normais a estimulação da linfoproliferação por IL-15 foi inibida pela presença de anti-IL-15, o que não ocorreu com a presença de IgG controle. Esta dose do anticorpo foi utilizada nos experimentos seguintes.

5.3.2 Ação de anti-IL-12 e de anti-IL-15 na línfoproliferação

CMSP de 19 pacientes com LCM foram estimuladas com antígeno de *L. amazonensis*, ocorrendo aumento da proliferação na maioria dos pacientes testados (média±DP com meio apenas=569±802 cpm e com antígeno de leishmânia=30030±31100 cpm), com $p=0,001$ (Figura 7 A). Para determinar o papel da IL-12 e da IL-15 produzida endogenamente na resposta imune celular de pacientes com LCM, CMSP foram estimuladas com antígeno de *L. amazonensis* na presença de anticorpos monoclonais (mAbs) anti-IL-12 e anti-IL15 na concentração 10 µg/ml. Na presença de 10 µg/ml de anti-IL-12 e antígeno, a média da resposta proliferativa foi de 24400±26820 cpm, a diferença em relação ao estímulo antigênico somente não tem significado estatístico, com $p=0,16$ (Figura 7 B). A anti-IL-15 não alterou a resposta e a média foi de 29740±33230 cpm. Com o uso combinado de anti-IL-12 (5 µg/ml) e anti-IL15 (5µg/ml) a média diminuiu para 23620±24550 cpm, mas apesar da redução, a diferença não é estatisticamente significativa, $p=0,10$ (Figura 7 D). Resultados de todos os experimentos são mostrados em cpm na tabela apêndice C.

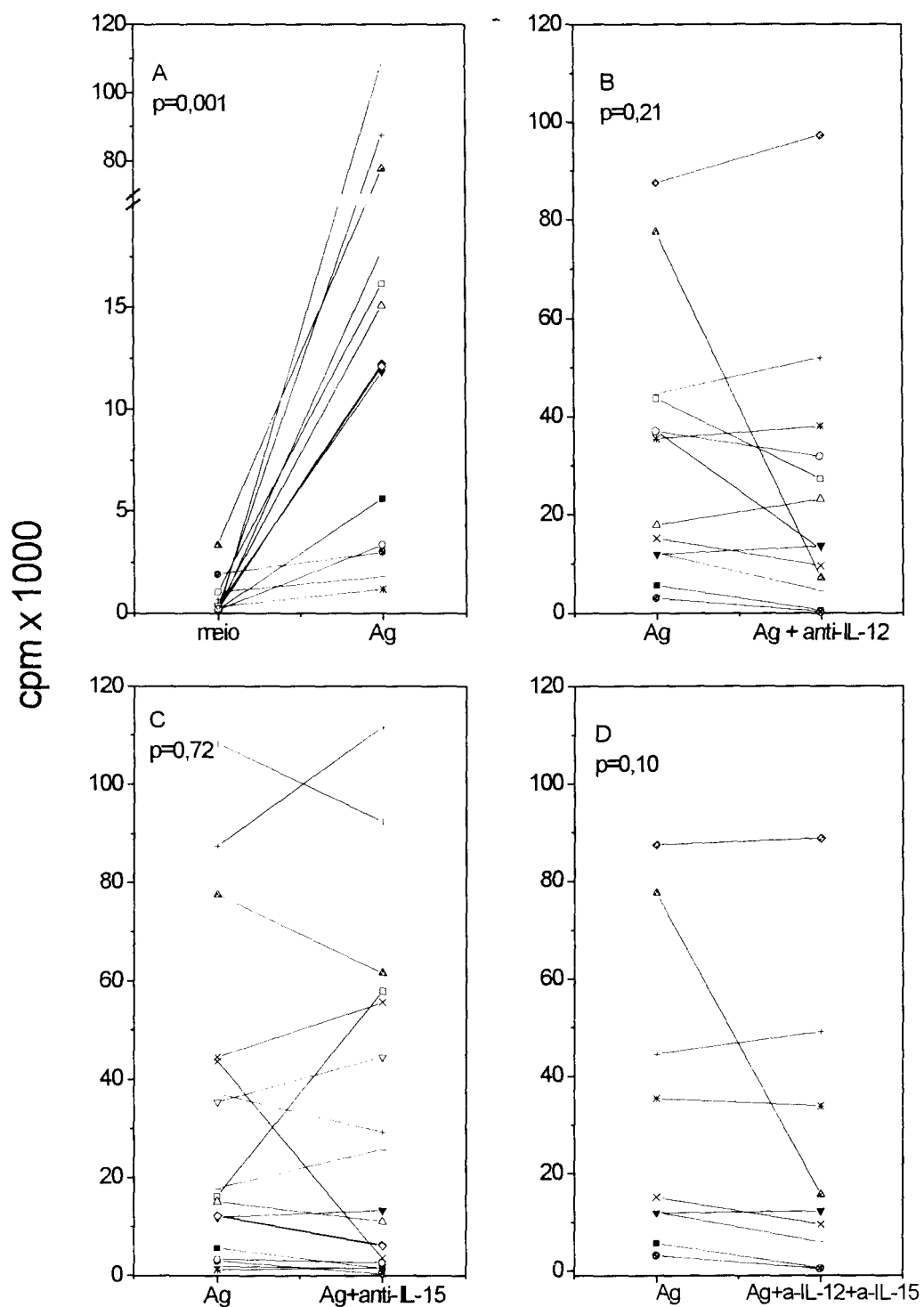


Figura 7. Efeito de anticorpos monoclonais anti-IL-12 e/ou anti-IL-15 na linfoproliferação de pacientes com LCM. CMSP foram estimuladas com 5 μ g/ml de antígeno de *L. amazonensis* (Ag) na presença de anti-IL-12 e/ou anti-IL-15 (10 μ g/ml). Após cultivo por 5 dias foi medida a incorporação de [3H] timidina. Resultados são mostrados em cpm.

5.3.3 Ação de anti-IL-12 e de anti-IL-15 na produção de IFN- γ

Após estimulação com 5 μ g/ml de antígeno de *L. amazonensis*, todos os 11 pacientes com LCM testados apresentaram aumento na produção de IFN- γ . A produção média de 16 \pm 29 pg/ml sem antígeno aumentou para 1100 \pm 753 pg/ml após estímulo antigênico, com $p=0,001$ (Figura 8 A). A neutralização de IL-15 não reduziu esta produção. Anticorpo monoclonal anti-IL-12 levou a inibição de produção de IFN- γ cujo resultado foi estatisticamente significativo tanto isoladamente quanto associado a anti-IL15 com $p=0,02$ e $p=0,05$ respectivamente (Figura 8, B e D). As médias da concentração de IFN- γ no sobrenadante, na presença de antígeno com anti-IL-12, anti-IL-15 ou ambos foram 839 \pm 776, 1058 \pm 729 e 985 \pm 742 pg/ml respectivamente (Figura 8 B, C e D).

5.3.4 Ação de anti-IL-12 e anti-IL-15 na citotoxicidade

Elevada resposta citolítica contra células K562 foi observada em CMSP de quatro dos sete pacientes estudados com LCM após cultivo com 5 μ g/ml de antígeno de *L. amazonensis* ($p=0,03$; Figura 9 A). Com o objetivo de verificar se a IL-12 e a IL-15 produzidas endogenamente são importantes no desenvolvimento desta resposta, foram acrescentados anticorpos monoclonais anti-IL-12 e/ou anti-IL-15 durante a geração de células efectoras estimuladas com antígeno de leishmânia. A média após estimulação com antígeno foi 42 \pm 27% de lise específica e na presença de anti-IL-12, anti-IL15 e anti-IL-12+anti-IL-15 foram respectivamente 42 \pm 32, 46 \pm 31% e 39 \pm 29 de lise específica. As diferenças entre as médias de citotoxicidade não foram estatisticamente significantes (Figura 9 B, C e D). Portanto, anticorpos anti-IL-12 ou anti-IL-15 não reduziram a alta taxa de citotoxicidade apresentada pelos pacientes com LCM.

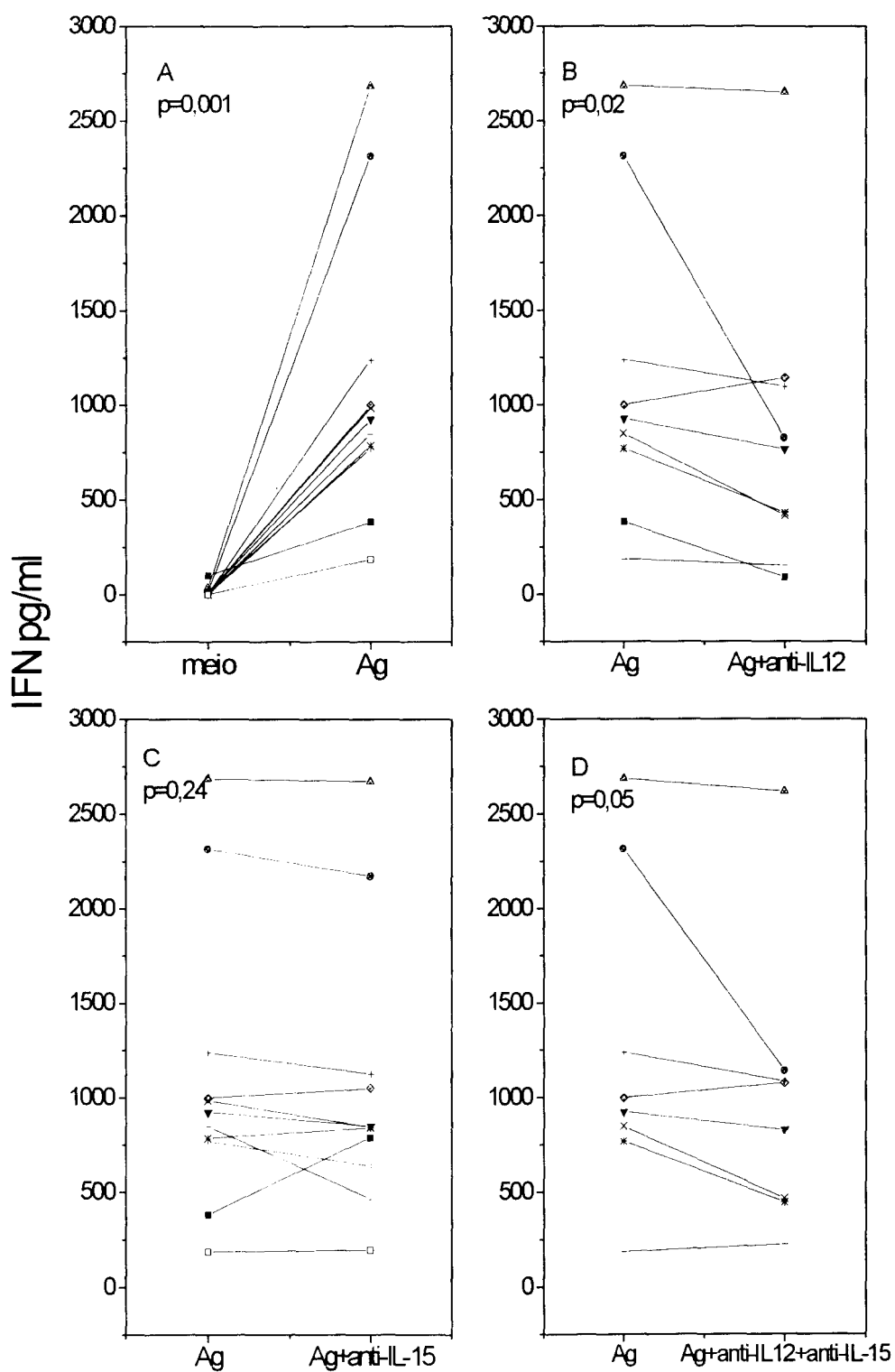


Figura 8. Produção de IFN- γ por CMSP de pacientes com LCM após estímulo com 5 μ g/ml de antígeno de *L. amazonensis* (Ag) na presença de anticorpos monoclonais anti IL-12 e/ou IL-15. As CMSP foram cultivadas por 5 dias e então foi dosado IFN- γ no sobrenadante através de ELISA.

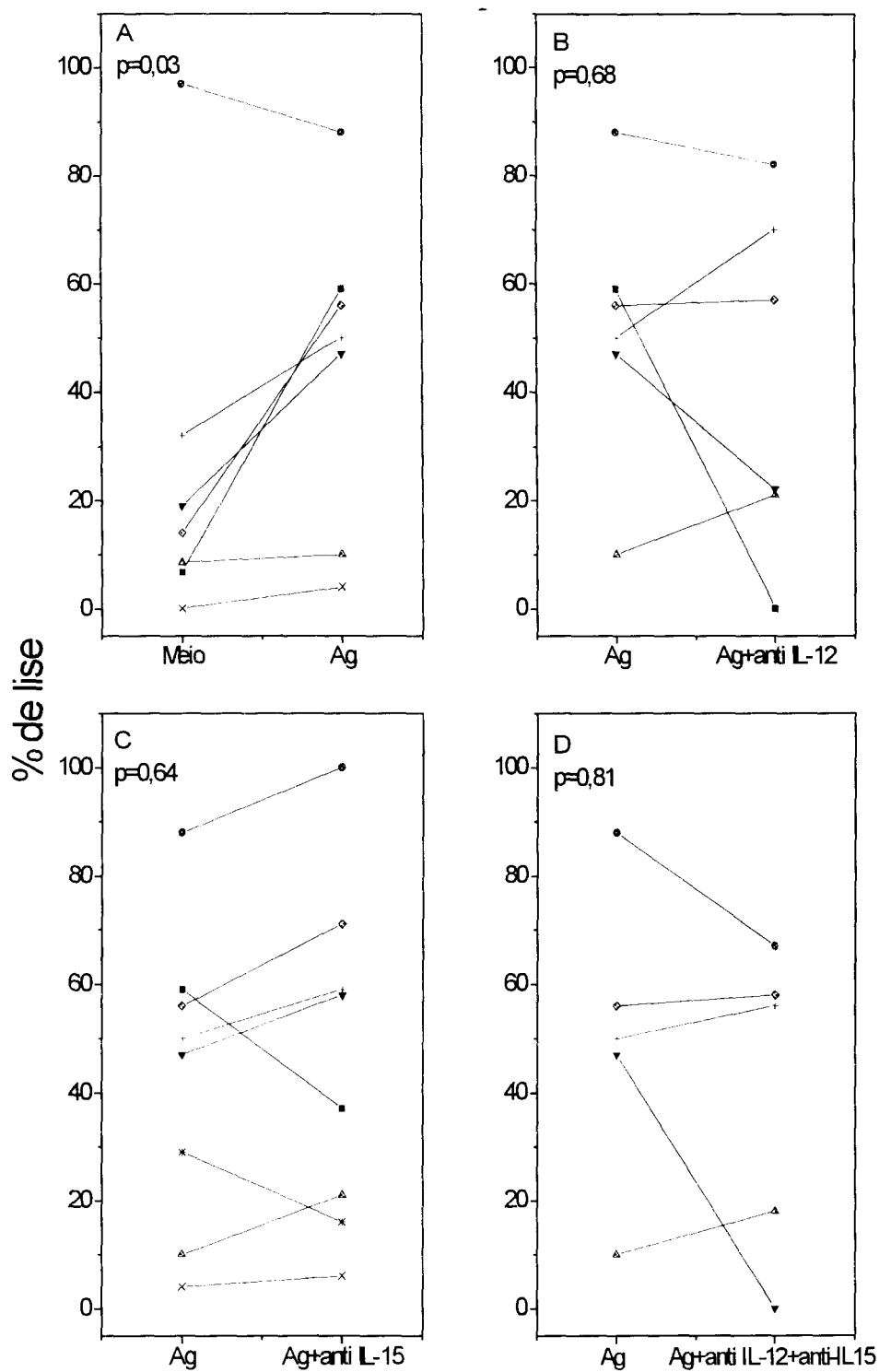


Figura 9. Citotoxicidade em pacientes com LCM. CMSP foram separadas e cultivadas por 5 dias, estimuladas com $5\mu\text{g/ml}$ de antígeno de *L. amazonensis* (Ag) na presença ou não de anticorpos monoclonais anti-12 e/ou anti-IL-15 e incubadas com células tumorais K562 (células alvo) radiomarcadas com ^{51}Cr na proporção 100:1. Os resultados são expressos em % de lise específica.

5.4. Papel de IL-12 p40 sérica em pacientes com leishmaniose.

Com o objetivo de explorar a possível variação na produção de IL-12 p40 nas diferentes formas de leishmaniose, comparamos os níveis séricos observados em pacientes não responsivos (LVA) com pacientes hiperresponsivos (LTA). Determinamos os níveis séricos deste produto, através de ELISA, em soros de 15 pacientes com LVA, 10 com LTA e 15 controles não infectados de área endêmica para leishmaniose. Os pacientes com LVA apresentaram níveis muito mais elevados de IL-12 p40 (302 ± 197 pg/ml de média \pm DP) que pacientes com LCM e controles normais (119 ± 37 e 93 ± 20 pg/ml respectivamente). A diferença entre o primeiro grupo e os dois seguintes foi estatisticamente significante (Figura 10).

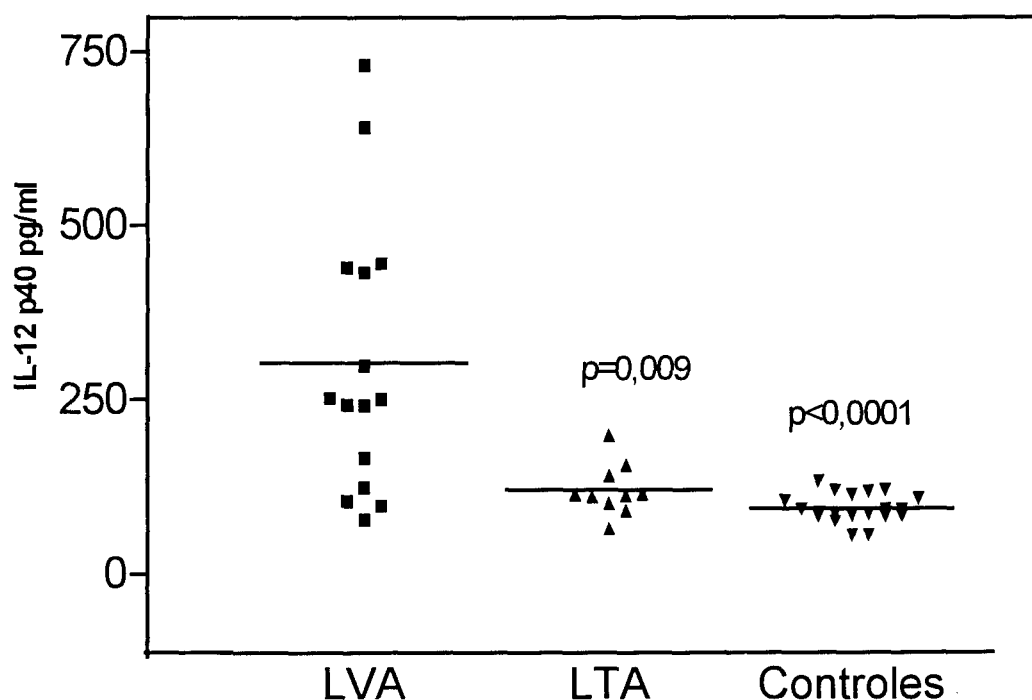


Figura 10. Concentração sérica de IL-12 p40, avaliado por ELISA em pacientes com LVA (n=15), LTA (n=10) e em controles normais (n=15). As barras horizontais representam a média de cada grupo. Os valores de p referem-se a significância estatística dos grupos quando comparados com o grupo de LVA.

Para determinar se esta elevação era característica da fase aguda da doença comparamos pareadamente o soro de pacientes com LVA antes e após o tratamento. Observamos que houve uma redução na concentração de IL-12 p40 após a cura da doença. Esta redução foi estatisticamente significativa, com $p=0,007$ (Figura 11).

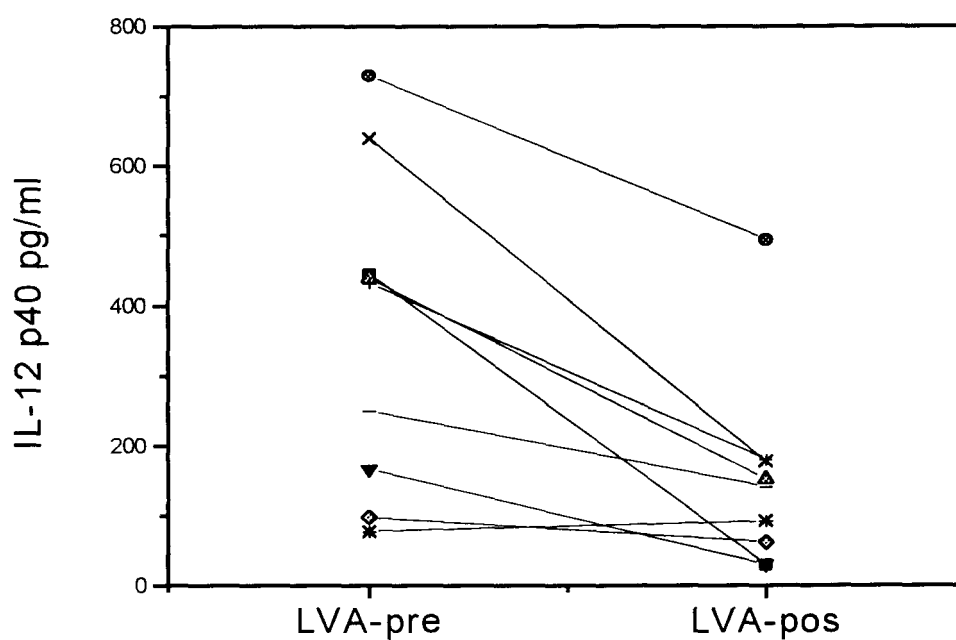


Figura 11. Comparação do nível plasmático de IL-12 p40, avaliado através de ELISA, antes (LVA-pre) e após (LVA-pos) a cura dos pacientes com LVA.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo nós investigamos o papel da IL-15 e da IL-12 na resposta imune celular em diferentes formas de leishmaniose humana. Na LVA, as CMSP, apesar de apresentarem anergia específica contra antígeno de leishmânia, sofreram proliferação na presença de IL-15 quando incubadas apenas com meio de cultura ou com antígeno de leishmânia. Isto confirma dados publicados por CARVALHO e cols. (1989) que demonstraram que estes pacientes são capazes de apresentar resposta linfoproliferativa contra outros antígenos como PPD ou *C. albicans*.

A IL-15 apresenta atividades biológicas muito semelhantes a IL-2, como indução de proliferação dose-dependente de células T CD4⁺ de memória e de células T CD8⁺ “naive” e de memória (KENEGANE e cols., 1996) e liga-se ao mesmo receptor de afinidade intermediária da IL-2, o IL-2Rβγ (GRABSTEIN e cols., 1995). O mecanismo pelo qual a IL-15 induz proliferação não é totalmente conhecido, mas, um estudo demonstrou que a IL-15 interage e induz fosforilação da tirosina das subunidades beta e gama do IL-2R e ativa MAPK e LCK (ADUNYAH e cols., 1997). A IL-2 é a principal citocina responsável pela proliferação de linfócitos T e a regulação deste estímulo ocorre de forma autócrina e parácrina através do aumento da secreção da própria IL-2 ou do seu receptor aumentando a afinidade da ligação (ABBAS, 1997). Células T em repouso (com baixa concentração de IL-2Rβγ e ausência de IL-2Rα) proliferam em concentrações de IL-2 na ordem 1×10^{-9} M. Células T parcialmente ativadas apresentam alta expressão de IL-2βγ e respondem a concentrações de IL-2 bem menores (10^{-11} M) que as células T em repouso. Células parcialmente ativadas são encontradas em situações fisiológicas, o que explica a ação da IL-2 sobre linfócitos T mesmo na ausência de um antígeno adicionado intencionalmente

(MINAMI E COLS.; 1993). Como a IL-15 também utiliza o receptor IL-2 $\beta\gamma$ isto pode explicar porque foi capaz de ativar as células nos nossos experimentos mesmo na ausência do antígeno, sugerindo que grande variação do índice de estimulação (IE) entre os indivíduos com LVA ou controles provavelmente deve-se à quantidade de receptores disponíveis nas células, e conseqüentemente ao grau de pré-ativação destas. A média do IE dos controles com 1 ng/ml de IL-15, na ausência de antígeno, foi de $13,7\pm 12,6$ enquanto que na LVA foi de $9,5\pm 7,8$. Na presença de 10 μ g/ml de antígeno de leishmânia não houve proliferação nos controles, cuja média foi de $1,1\pm 0,7$, e variou muito nos pacientes com LVA (com IE de 1 a 48), possivelmente porque os pacientes se encontravam em diferentes estágios da doença, com variação da duração e gravidade. Apesar da indução de proliferação com IL-15 em pacientes com LVA não depender da adição de antígeno de leishmânia, ela foi dose dependente. IL-12 (5 ng/ml) não elevou o IE nas culturas com IL-15, demonstrando que não houve sinergismo na indução de proliferação entre estas duas citocinas como seria esperado.

Outros estudos mostraram que a IL-15 é capaz de restaurar a resposta imune específica em patologias onde a imunidade celular está comprometida. Em CMSP de 22 indivíduos infectados pelo HIV, mesmo em concentrações tão elevadas quanto 10 ng/ml, a IL-15 não induziu linfoproliferação na ausência de outros estímulos, mas, em presença de antígeno de cândida isto ocorreu também de forma dose-dependente, indicando que a IL-15 foi capaz de reverter a ausência de resposta imune destes pacientes. Neste mesmo estudo a IL-12 revelou efeito mitogênico, porém, não foram apresentados resultados em controles normais (PATKI e cols. 1996). SEDER e cols. (1995), também em indivíduos portadores do HIV, demonstraram que a IL-15 potencializava a resposta tanto a estímulos mitogênicos quanto a antígenos do vírus. JULLIEN e cols. (1997) demonstraram que, em

pacientes com forma virchowiana de hanseníase, a IL-15 em doses sub-ótimas (1ng/ml) não induziu linfoproliferação inespecífica, ao passo que foi capaz de restaurar a resposta celular específica a antígeno de *M. leprae*.

Em nosso estudo, a produção de IFN- γ foi mais elevada na presença de IL-12 que na de IL-15, tanto em pacientes com LVA quanto com LCD. A IL-15, nas doses testadas, apesar de induzir proliferação, não induziu a produção de IFN- γ , fundamental na defesa contra o parasito. Foi descrito que em pacientes HIV positivos a IL-15, apesar de restaurar a capacidade proliferativa, não leva a aumento na produção de IFN- γ na dose de 5ng/ml, que também foi a dose usada em nosso trabalho (SEDER e cols., 1995). Em doses elevadas, 300 ng/ml, a IL-15 direciona células CD4 a secretar IFN- γ , mas não sabemos se tal dose é factível de ser alcançada terapêuticamente *in vivo* (SEDER e cols., 1996). Principalmente na leishmaniose experimental, a IL-12 tem sido amplamente estudada e foi apontada como uma importante citocina envolvida no direcionamento da resposta imune para um padrão tipo Th1 (SCHARTON-KERSTEN e cols., 1995). A maioria destes estudos demonstra que a ação da IL-12 deve-se principalmente a produção de IFN- γ . Existe controvérsia quanto ao fato da IL-12 necessitar ou não da presença de IFN- γ para iniciar a resposta tipo Th1 (TRINCHIERI & SCOTT, 1994). Em um estudo anterior, onde 12 pacientes com LVA foram avaliados, a IL-12 foi capaz de restaurar tanto a capacidade de proliferação quanto a produção de IFN- γ (BACELLAR e cols., 1996). Nossos resultados com a IL-12 não foram significativos, talvez pelo menor número de pacientes testados e pelo fato de que houve aumento da produção de IFN- γ em apenas três dos quatro pacientes testados. Também encontramos resultado semelhante em um dos três pacientes com LCD. O fato de que nem todos os pacientes reverteram a anergia na presença de IL-12 talvez deva-se à necessidade de outros estímulos como citocinas ou

moléculas coestimulatórias. Em três dos quatro controles testados, a IL-12 induziu produção de IFN- γ após estímulo com antígeno de leishmânia. Como estes controles são voluntários do próprio laboratório, que trabalharam previamente com manipulação de leishmânias, possivelmente tratam-se de indivíduos sensibilizados através da via inalatória ou cutânea. IL-12 é uma citocina capaz de induzir proliferação em células estimuladas, mas não em células em repouso. Este resultado indica que a adição de IL-12 foi necessária para induzir um efeito diferenciador nas células cultivadas, direcionando a resposta para a produção de IFN- γ , que constitui uma ação previamente descrita desta citocina (TRINCHIERI, 1995). Este experimento deverá ser repetido utilizando diferentes doses do antígeno e comparando com controles não expostos.

Por ser secretada por macrófagos, e podendo substituir a IL-2, a IL-15 poderia ter um papel importante na leishmaniose, desde quando existem fortes evidências do papel desta citocina na imunidade inata. Nossos resultados indicam que a IL-15, por não ter aumentado a produção de IFN- γ em doses mais baixas e não ter ação sinérgica com a IL-12, não parece ter um papel importante na resposta imune da leishmaniose.

O TGF- β , uma citocina também produzida por macrófagos, mostrou-se um potente inibidor da ação de IL-12 associada a IL-15 na produção de IFN- γ por células NK (CARSON & CALIGIURI, 1996). Na leishmaniose, TGF- β tem um papel na imunossupressão, sendo capaz de inibir a ação de IFN- γ na ativação macrofágica (BARRAL e cols., 1995 b). Seria importante avaliar se TGF- β poderia ser responsável por esta ausência de resposta específica a adição de IL-15.

A IL-15, assim como a IL-2, induz proliferação e diferenciação de células B ativadas, levando a produção policlonal de imunoglobulinas (ARMITAGE e cols., 1995). Em pacientes com AIDS a hipergamaglobulinemia se correlaciona com a concentração sérica

de IL-15 (KACANI e cols., 1997). Na imunoregulação da LVA, onde também ocorre uma hipergamaglobulinemia policlonal, talvez a IL-15 tenha um papel nesta característica da doença, ou seja, sua participação pode também estar relacionada a patogênese e desregulação.

Apesar da defesa contra a leishmânia ser tradicionalmente relacionada a produção de citocinas, vários estudos têm demonstrado que a citotoxicidade pode também ser importante na destruição dos parasitos no interior dos fagócitos. Na LVA, assim como na infecção pelo HIV, ocorre uma diminuição da resposta citotóxica (HARMS e cols., 1996). Em nosso estudo, apesar de quatro dos oito pacientes com LVA apresentarem um aumento na atividade citotóxica na presença de antígeno de leishmânia, este resultado não foi estatisticamente significativo. IL-15 é um potente ativador da resposta citotóxica, podendo levar a um aumento da atividade de células NK tanto em indivíduos portadores do HIV quanto em doadores normais (LOBEAU e cols., 1996). Nossos experimentos confirmam este dado, visto que todos os oito pacientes com LVA onde foi avaliada a resposta citotóxica responderam a adição de IL-15 ao meio de cultura provavelmente devido a ativação de células NK, já que este fenômeno ocorreu na presença ou não de antígeno de leishmânia e que as células NK são as principais responsáveis pela lise das células alvo K562 (BARRAL-NETTO e cols. 1995). Além de possuir o receptor tipo IL-2R $\beta\gamma$ assim como células T em repouso, as células NK também possuem o receptor para IL-15 (IL-15R α), onde a IL-15, mesmo em doses baixas, pode se ligar e induzir ativação e proliferação, de forma semelhante ao efeito de IL-2 produzindo as células LAK (ABBAS, 1997). Este resultado parece ser independente da produção de IFN- γ , que, como já havia sido citado acima, não estava aumentado no sobrenadante destas culturas, reforçando a hipótese de ação direta da IL-15 sobre as células NK. CHEHIMI e cols. (1997),

estudando pacientes com HIV, descreveram que o aumento da atividade citóxica provocado pela IL-15 não é revertido pelo bloqueio de IFN- γ ou de IL-12 com anticorpos monoclonais. A adição de IL-12 nas culturas levou a um aumento da resposta citotóxica em menor intensidade que a IL-15 isoladamente e a intensidade foi semelhante quando utilizamos as duas citocinas. A IL-12 induz proliferação de células NK ativadas com intensidade cerca de 50% menor que a IL-2 (citocina com atividades comuns à IL-15), e, quando associada a esta, é capaz de inibir a proliferação levando a níveis semelhantes aos obtidos com IL-2 isoladamente (PERUSSIA e cols., 1992). Talvez devido ao pequeno número de pacientes testados, não houve diferença estatisticamente significativa entre IL-15 e IL-15+IL-12, mas é possível que tenha ocorrido um antagonismo da ação destas citocinas. A adição de IL-12, nestas condições, pode induzir uma alteração da cinética de resposta; situação em que a resposta máxima pode ter ocorrido antes do momento da avaliação do estudo.

Na LCM, onde reconhecidamente ocorre uma intensa resposta imune celular (CARVALHO e cols., 1985), a IL-12 parece ter um importante papel no início da infecção (MELBY e cols. 1996). Em um modelo murino, a IL-12 produzida endogenamente, mostrou-se importante na defesa contra a leishmânia, tanto na fase inicial da doença quanto na manutenção da resposta (HEINZEL e cols., 1995). Em nossos experimentos, de acordo com os dados acima, o bloqueio da ação da IL-12 foi capaz de inibir a produção de IFN- γ de forma significativa, apesar de ocorrer em apenas quatro dos sete pacientes testados. Neutralização de IL-12 não inibiu a linfoproliferação. Em cultivos de linfonofodos de camundongos C3H infectados com *L. major*, anticorpos anti-IL-12 inibem a produção de IFN- γ (SCHARTON-KERSTEN e cols., 1995). Anti-IL-12 também inibe a linfoproliferação de CMSP de indivíduos normais induzidas por vírus da influenza ou por antígeno linfocitário humano (CLERICI e cols., 1993). Anticorpo anti-IL-15 não foi capaz

de inibir a linfoproliferação e a produção de IFN- γ como também não potencializou a ação da anti-IL-12.

Na análise da resposta citotóxica de CMSP de pacientes com LTA contra células tumorais observamos uma resposta heterogênea, mas houve um aumento significativo na atividade citolítica após estímulo com antígeno de leishmânia. O fato da resposta citotóxica se correlacionar com a resposta imune celular, visto que pacientes com LVA não aumentam a citotoxicidade após estímulo com antígeno, sugere que citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ participem deste fenômeno. Resultados semelhantes já haviam sido relatados por BARRAL-NETTO e cols. (1995), que constataram que tanto pacientes com LCL quanto LCM tiveram aumento de atividade de células NK após estimulação. Posteriormente, BRODSKYN e cols. (1997) demonstraram que a citotoxicidade era também relacionada a células T citotóxicas CD8+, visto que macrófagos autólogos infectados por leishmânia eram reconhecidos e destruídos por células efetoras de pacientes com LCM estimulados com antígeno de leishmânia. Neste mesmo estudo foi descrito o papel da IL-12 e do IFN- γ produzido endogenamente durante a geração das células efetoras. A IL-15 é um potente ativador de células NK e de células CD8+ ativadas que se liga ao mesmo receptor da IL-2 (GRABSTEIN e cols., 1994). Em nosso estudo, anticorpo monoclonal anti-IL-15 não reduziu a ativação de citotoxicidade de CMSP de pacientes com LCM estimuladas com antígeno. Certamente esta resposta é mediada por um conjunto de citocinas, principalmente por IL-2 e IFN- γ , e o bloqueio de IL-12 e/ou IL-15 não foi suficiente para inibir a citotoxicidade para células K562. Devido ao fato de pacientes com LCM apresentarem maior atividade citolítica, a citotoxicidade foi apontada como um fator patogênico nesta doença. Além disto, a lise de macrófago infectado por células CD8+ não necessariamente leva a destruição do parasito (SMITH e cols., 1991). Porém esta hipótese

é contrária ao fato de que em pacientes curados para LTA, a análise fenotípica dos linfócitos reacionais a antígenos de leishmânia mostram um equilíbrio entre $CD4^+$ e $CD8^+$, e em pacientes com doença ativa, o predomínio é de células $CD4^+$, sugerindo que as células $CD8^+$ devam também ter um importante papel no processo de cura (COUTINHO e cols., 1996). Além disto, MAASHO e cols. (1998) demonstraram que CMSP de indivíduos normais ou imunizados de uma área endêmica eram capazes de responder a estímulo por antígeno de leishmânia com proliferação principalmente de células $CD8^+$ e células NK, indicando que estas células estão envolvidas na proteção contra a leishmânia.

A análise de RNA-m para diversas citocinas permite uma avaliação do padrão local de resposta imune. Estudando lesões cutâneas de pacientes com LCL, LOUZIR e cols. (1998) demonstraram que pacientes com evolução desfavorável apresentavam níveis mais elevados de RNA-m para IL-10, IL-12 e IFN- γ . A expressão de RNA-m para IL-15 é mais evidente em pacientes com forma tuberculóide da hanseníase quando comparadas com a forma virchowiana, este dado indica que a IL-15 aumenta a resposta celular local, estando relacionada com melhor evolução nesta doença (JULLIEN e cols., 1997). Como não encontramos evidências de que a manipulação *in vitro* da IL-15 modifica a resposta imune na leishmaniose, seria importante avaliar a expressão desta citocina *in vivo*, em lesões de pacientes com leishmaniose no sentido de melhor verificar o papel da IL-15 nesta doença. Nosso estudo documentou que a IL-15 pode ter uma ação mitogênica e indutora de citotoxicidade em CMSP, e, para maiores esclarecimentos quanto ao papel dela na leishmaniose, deve ser pesquisado a produção de IL-15 ou a expressão de RNA-m tanto em CMSP de pacientes com LVA quanto com LCM. É possível que a não diminuição da proliferação na LCM pelo anti-IL-15 deva-se ao fato de que não existe IL-15 para ser suprimida e neste caso IL-2, IL-12, IFN- γ seriam as responsáveis pela hiperresponsividade na LCM.

O soro de pacientes com LVA é capaz de suprimir respostas imunes como proliferação, produção de IFN- γ e de IL-2 de linfócitos de indivíduos sadios na presença de antígenos ou mitógenos. Algumas moléculas como complexos imunes e lípidas apresentam níveis séricos elevados que se correlacionam com este fenômeno (BARRAL e cols., 1986). O receptor solúvel de IL-2 que é encontrado em níveis muito mais elevados no soro de pacientes com LVA (4299 ± 2351) quando comparados com os níveis de controles sadios (180 ± 94) foi implicado neste fenômeno. A remoção deste receptor do soro de pacientes com LVA, utilizando anticorpo monoclonal anti-tac (anti-IL-2R α) levou a uma diminuição na capacidade imunossupressiva. Mas, como o soro de alguns destes pacientes permanecia com capacidade imunossupressiva foi sugerido que outros fatores também poderiam estar envolvidos (BARRAL-NETTO e cols., 1991). Recentemente foi descrito que a subunidade p40 da IL-12 forma homodímeros que são capazes de se ligar ao IL-12R bloqueando a ligação da citocina e funcionando como um antagonista. Camundongos tratados com o homodímero IL-12 p40 e posteriormente desafiados com endotoxina produziram 80% menos IFN- γ durante a endotoxemia quando comparados com camundongos não tratados (HEINZEL e cols., 1997). Foi demonstrado que mulheres com endometriose apresentam concentrações elevadas de IL-12 p40 no líquido peritoneal e a relação p40 livre/IL-12 se correlaciona com a severidade da doença. Além disto, a IL-12 p40 foi capaz de inibir in vitro a citotoxicidade contra células endometriais induzida por IL-12 (MAZZEO e cols., 1998). No nosso estudo, comparamos a concentração sérica da IL-12 p40 de pacientes na fase aguda da LVA antes (média= 302 ± 197) e após o tratamento (média= 151 ± 141), e observamos que havia uma significativa redução relacionada a cura da doença. Este resultado indica que a IL-12 p40 seja um marcador da doença em sua fase aguda e que possa constituir mais um dos fatores séricos solúveis capazes de induzir a

imunossupressão. Estudos futuros utilizando modelos experimentais ou cultivos *in vitro*, que permitam a manipulação de IL-12 p40, poderão investigar o papel desta molécula na imunossupressão da leishmaniose visceral.

Além da avaliação da imunorregulação, estudos com citocinas visam também avaliar o potencial uso destas como imunomoduladores. A IL-15 tem sido testada em modelos animais de tumores malignos, onde, além de demonstrar uma resposta efetiva contra a doença, apresentou menor toxicidade que a IL-2, que é comercialmente aprovada e utilizada para uso em alguns tumores humanos (MUNGER e cols., 1995, EVANS e cols., 1997). A IL-12 foi utilizada com sucesso em modelos experimentais de leishmaniose como adjuvante na produção de vacinas e como agente terapêutico, principalmente por sua capacidade de induzir a produção de IFN- γ (AFONSO et al, 1994, NABORS e cols., 1995). Porém, a IL-12, quando testada em um estudo de fase II para tratamento de carcinomas metastáticos, mostrou intensa toxicidade, com óbito de 2 dos 17 pacientes (LAMONT & ADORINI, 1996).

Recentemente foi clonada uma citocina, denominada IL-18, que é capaz de induzir produção de IFN- γ e é secretada por macrófagos ativados e células de Kupffer (OKAMURA e cols., 1995). Tem ação como um fator coestimulatório em clones de células tipo Th1 estimuladas por antígeno e age sinergicamente com a IL-12 na indução de produção de IFN- γ (KOHNO e cols., 1997). Em um modelo murino de infecção pelo fungo *Cryptococcus neoformans*, a injeção de IL-18 mostrou um papel protetor, mediado por secreção de IFN- γ (KAWAKAMI e cols., 1997). Estas características da IL-18 indicam que esta citocina potencialmente é importante na defesa contra a infecção pela leishmânia devendo ser comparada com a IL-12.

7 CONCLUSÕES

- O papel da IL-15 na LVA não parece ser relevante pois:
 - a) Os efeitos observados com esta citocina não excedem `aqueles` em células sem estímulo antigênico ou mesmo `aqueles` observados em indivíduos normais.
 - b) IL-15 não induz produção de IFN- γ , molécula diretamente responsável pela indução de atividade leishmanicida do macrófago.
 - c) IL-15 não potencializa a ação de IL-12 na reversão da imunossupressão de pacientes com LVA.
- IL-15 endógena não tem papel importante na elevada resposta imune na LCM, ou, mais provavelmente, exerce seu papel concomitante a várias outras moléculas, de tal modo que sua neutralização não resulta em efeitos mensuráveis.
- A redução de IL-12 p40 no soro pode ser um marcador de cura da LVA.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHMAN, A.H.; POBER, J.S. *Cytokines* In: *Cellular and molecular immunology*. 3.ed. - Philadelphia: Saunders, 1997. p.250-77.
- ABDI, K. & HERRMANN, S. CTL generation in the presence of IL-4 is inhibited by free p40. **J. Immunol.**, **159**: 3148-55, 1997.
- ADUNYAH, S.E.; WHEELER, B.J.; COOPER, R.S. Evidence for the involvement of LCK and MAP kinase (ERK-1) in the signal transduction mechanism of interleukin-15. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **232**: 754-58, 1997.
- AFONSO, L.C.C. & SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, **61**: 2952-59, 1993.
- AGOSTINI, C.; TRENTIN, L.; SANCETE, R.; FACCO, M.; TASSINARI, C.; CERUTI, A.; BORTOLIN, M.; MILANI, A.; SIVIERO, M.; ZAMBELLO, R.; SEMENZATO, G. Interleukin-15 triggers activation and growth of the CD8 T-cell pool in extravascular tissues of patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Blood**, **90**: 1115-23, 1997.
- ALMEIDA, R.; ROCHA, P.; JESUS, A.R.; COSTA, J.; CARVALHO, E.M. Evaluation of cellular immune responses in patients with different forms of tegumentary leishmaniasis. **Allergy & Immunol.**, **14**: 11-9, 1995.
- AL-JURAYYAN, N.A.M.; AL-NASSER, M.N.; AL-FAWAZ, I.M.; AL AYED I.H.; AL HERBISH, A.S., AL-MAZROU, A.M.; AL SOHAIBANI, M.O. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. **J. Trop. Ped.**, **41**: 143-48, 1995.

- ANDRADE, T.M.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **162**: 1354-59, 1990.
- ARMITAGE, R.J.; MACDUFF, B.M.; EISENMAN, J.; PAXTON, R.; GRABSTEIN, K.H. IL-15 has stimulatory activity for induction of B cell proliferation and differentiation. **J. Immunol.**, **154**: 483-90, 1995.
- ATEDZOE, B.N.; AHMAD, A.; MENEZES, J. Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. **J. Immunol.** **159**: 4966-72, 1996.
- BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRAL-NETTO, M.; COSTA, C.H.; COFFMAN, R.L.; JOHNSON, W. D.; CARVALHO, E.M. Interleukin-12 restores interferon- γ production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **173**: 1515-8, 1996.
- BADARO, R.; JONES, T.C.; LOURENCO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR., W.D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J. Infect. Dis.**, **154**: 639-49, 1986.
- BARRAL, A.; CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M. Suppression of lymphocyte proliferative responses by sera from patients with american visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **35**: 735-42, 1986.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JR., G.; MOMEM, H.; McMAHON-PRATT, D.; JESUS, A.R.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON JR. W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **44**: 536-46, 1991.

- BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIC, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania brasiliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **90**: 3442-46, 1993.
- BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; BONFIM, G.; CORREIA, D.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania brasiliensis*. **Am. J. Trop. Hyg.**, **53**: 256-59, 1995a.
- BARRAL, A.; TEIXEIRA, M.; REIS, P.; VINHAS, V.; COSTA, J.; LESSA, H.; BITTENCOURT, A.L.; REED, S.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO. Transforming growth factor- β in human cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, **147**: 947-53, 1995b.
- BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; SANTOS, S. B.; CARVALHO, E.M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; REED, S. G.; JOHNSON JR., W. D. Soluble IL-2 receptor as serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **147**: 281-84, 1991a.
- BARRAL-NETO, M.; BADARÓ, R.; BARRAL, A. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. **J Infect Dis** **163**: 853-7, 1991b.
- BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E.M.; REED, S.G. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, **17**: 21-8, 1995.
- BARRAL-NETO, M.; BRODSKYN, C.; BONFIM, G.; BARRAL, A. Cytokine regulation in human cutaneous leishmaniasis. In: CACERES-DITTIMAR, G. & SANCHEZ, M.A. *Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis*. Tapia: R.G. Landes company, 1996.

- BITTENCOURT, A.L.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int. J. Dermatol.**, **34**: 474-79, 1995.
- BITTENCOURT, A.L. & BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: UEHLINGER, D. S., (ed) *Tropical pathology.*, 2. ed. Berlin: Springer, 1995. v. 8. p.597-650.
- BLUMAN, E.M.; BARTYNSKI, K.J.; AVALOS, B.R.; CALIGIURI, M.A. Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 α in response to monocyte-derived cytokines. **J. Clin. Invest.**, **97**: 2722-27, 1996.
- BONFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic responses in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, **84**: 188-94, 1996.
- BRODSKY, C.I.; BARRAL, A.; BOAVENTURA, V.; CARVALHO, E.; BARRAL-NETTO, M. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. **J. Immunol.**, **159**: 4467-73, 1997.
- CARRERA, L.; GAZZINELLI, R.; BADOLATO, R.; HIENY, S.; MULLER, W.; KUHN, R.; SACKS, D. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin-2 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **J. Exp. Med.**, **183**: 515-26, 1996.
- CARSON, W.E. & CALIGIURI, M.A. Minireview - Interleukin-15: a potential player during the innate immune response to infection. **Exp. Parasitol.**, **84**: 291-4, 1996.
- CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O.; BARRAL, A.; BADARO, R.; JOHNSON JR, W.D. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. **J. Clin. Invest.**, **83**: 860-4, 1989.

CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; JOHNSON JR., W.D. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **J. Infect. Dis.**, **165**: 535-40, 1992.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R.L.; REED, S.G. Restoration of IFN production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **152**: 5949-55, 1994.

CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKIN, C.I.; BACELLAR, O. Immunoregulation in leishmaniasis. **Ciênc. Cult.**, **46**: 441-5, 1994.

CHARKBARTI, G.; BASU, A.; MANNA, P.P.; BHATTACHARYA, S.; SEN, S.; BANDYOPADHYAY, S. Peripheral blood mononuclear cells of patients with indian visceral leishmaniasis suppress natural killer cell activity in vitro. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **90**: 582-85, 1996.

CLERICI, M.; LUCEY, D.R.; BERZOFSKY, J.A.; PINTO, L.A.; WYNN, T.A.; BLATT, S.P.; DOLAN, M.J.; HENDRIX, C.W.; WOLF, S.F.; SHEARER, G.M. Restoration of HIV-specific cell-mediated immune responses by interleukin-12 in vitro. **Science**, **262**: 1721-24, 1993.

COUTINHO, S.G.; OLIVEIRA, M.P.; DA CRUZ, A.M.; DE LUCA, P.M.; MENDONCA, S.C.; BERTHO, A.L.; SOONG, L.; McMAHON PRATT, D. T-cell responsiveness of american cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania brasiliensis*: immunologic patterns associated with cure. **Exp. Parasitol.**, **84**: 144-55, 1996.

DOHERTY, T.M.; SEDER, R.A.; SHER, A. Induction and regulation of IL-15 in murine macrophages. **J. Immunol.**, **156**: 735-41, 1996.

EVANS, R.; FULLER, J.A.; CHRISTIANSON, G.; KRUPKE, D.M.; TROUTT, A.B. IL-15 mediates anti-tumor effects after cyclofosfamide injection of tumor-bearing mice and enhances adoptive immunotherapy: the potencial role of NK cell subpopulations. **Cell. Immunol.**, **179**: 66-73, 1997.

GHALIB, H.W.; PIUVEZAM, M.R.; SKEIKY, Y.A.W.; SIDDIG, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAN, A.M.; RUSSO, D.M.; REED, S.G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest.**, **92**: 324-29, 1993.

GHALIB, H.W.; WHITTLE, J.A.; KUBIN, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAN, A.M.; GRABSTEIN, K.H.; TRINCHIERI, G.; REED, S.G. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **J. Immunol.**, **154**: 4623-29, 1996.

GILLESSEN, S.; CARVAJAL, D.; LING, P.; PODLASKI, F.J.; STREMLO, D.L.; FAMILLETTI, P.C.; GUBLER, U.; PRESKY, D.H.; STERN, A.S.; GATELY, M.K. Mouse interleukin-2 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. **Eur. J. Immunol.**, **25**: 200-06, 1995.

GRABTEIN, K.H.; EISENMAN, J.; SHANEBECK, K.; RAUCH, C.; SRINIVASAN, S.; FUNG, V.; BEERS, C.; RICHARDSON, J.; SCHOENBORN, M.A.; AHDIEH, M.; JOHNSON, L.; ALDERSON, M.R.; WATHSON, J.D.; ANDERSON, D.M.; GIRI, J. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor. **Science**, **264**: 965-68, 1994.

HARMS, G.; PEDROSA, C.; OMENA, S.; FELDMEIER, H.; ZWINGENBERGER, K. Natural killer activity in visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **85**: 54-5, 1991.

- HEINZEL, F.P.; RERKO, R.M.; AHMED, F.; PEARLMAN, E. Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. **J. Immunol.**, **155**: 730-39, 1995.
- HEINZEL, F.P., HUJER, A.M.; AHMED, F.N.; RERKO, R.M. In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. **J. Immunol.**, **158**: 4381-88, 1997.
- HEINZEL, F.P.; RERKO, R.M.; HUJER, A.M. Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity. **Cell. Immunol.**, **184**: 129-42, 1998.
- HOLADAY, B.J.; POMPEU, M.M.L.; EVANS, T.; BRAGA, D.N.M.; TEIXEIRA, M.J.; SOUZA, A.Q.; SADICK, M.D.; VASCONCELOS, A.W.; ABRAMS, J.S.; PEARSON, R.D.; LOCKSLEY, R.M. Correlates of leishmania-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.**, **167**: 411-17, 1993.
- JONES, D.; ELLOSO, M.M.; SHOWE, L.; WILLIAMS, D., TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. Differential regulation of the interleukin-12 receptor during the innate immune response to *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, **66**: 3818-24, 1998.
- JULLIEN, D.; SIELING, P.A.; UYEMURA, K.; MAR, N.D.; REA, T.H.; MODLIN, R.L. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. **J. Immunol.**, **158**: 800-06, 1997.
- KACANI, L.; STOIBER, H.; DIERICH, M.P. Role of IL-15 in HIV-associated hypergammaglobulinemia. **Clin. Exp. Immunol.** **108**:14-8, 1997.
- KANEGANE, H.; TOSATO, G. Activation of naïve and memory T cells by interleukin-15. **Blood**, **88**: 230-34, 1996.

- KARP, C.L.; EL-SAFI, S.H.; WYNN, T.A.; SATTI, M.M.H.; KORDOFANI, A.M.; HASHIM, F.A.; HAG-ALI, M.; NEVA, F.A.; NUTMAN, T.B.; SACKS, D. L. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **J. Clin. Invest.**, **91**: 1644-48, 1993.
- KATO, T.; SHIMOZATO, O.; HOSHI, K.; WAKIMOTO, H.; HAMADA, H.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Local production of the p40 subunit of interleukin 12 suppresses T-helper 1-mediated immune responses and prevents allogeneic myoblast rejection. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **93**: 9085-89, 1996.
- KAWAKAMI, K.; QURESHI, M.H.; ZHANG, T.; OKAMURA, H.; KURIMOTO, M.; SAITO, A. IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- γ production. **J. Immunol.** **159**: 5528-34, 1997.
- KENNEY, R.T.; SACKS, D.L.; GAM, A.A.; MURRAY, H.W.; SUNDAR, S. Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment. **J. Infect. Dis.**, **177**: 815-18, 1998.
- KOHONO, K.; KATAOKA, J.; OHTSUKI, T.; SUEMOTO, Y.; OKAMOTO, I.; USUI, M.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. IFN- γ -inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. **J. Immunol.**, **158**: 1541-50, 1997.
- LAMONT, A.G.; ADORINI, L. IL-12 a key cytokine in immune regulation. **Immunol. Today**, **17**:214-17, 1996.
- LOUBEAU, M.; AHMAD, A.; TOMA, E.; MENEZES, J. Enhancement of natural killer and antibody-dependent cytolytic activities of the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients by recombinant IL-15. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Human Retrovirol.**, **16**: 137-45, 1997.

- LOUZIR, H.; MELBY, P.C.; BEN SALAH, A.; MARRAKCHI, H.; AOUN, K.; BEN ISMAIL, R.; DELLAGI, K. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **J. Infect. Dis**, **177**: 1687-95, 1998.
- MAASHO, K.; SANCHEZ, F.; SCHURR, E.; HAILO, A.; AKUFFO, H. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis is a area of endemicity. **Infect. Immun.**, **66**: 2698-704, 1998.
- MAZZEO, D.; VIGANO, P.; BLASIO, A.M.; SINIGAGLIA, F.; VIGNALI, M.; PANINA BORDIGNON, P. Interleukin-12 and its free p40 subunit regulate immune recognition of endometrial cells: potencial role in endometriosis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **83**: 911-6, 1998.
- MELBY, P.C.; NARVAEZ, A.F.; DARNELL, B.J.; PACHECO, V.P. In situ expression of interleukin-10 and interleukin-12 in active human cutaneous leishmaniasis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, **15**: 101-7, 1996.
- MELBY, P.C.; YANG, Y.Z.; CHENG, J.; ZHAO, W. Regional diferences in the cellular immune response to experimental cutaneous nor visceral infection with *Leishmania donovani*. **Infect. immun.**, **66**: 18-27, 1998.
- MINAMI, Y. KONO, T.; MIYASAKI, T.; TANIGUCHI, T. The IL-2 receptor complex: its struture, function and target genes. **Ann. Rev. Immunol.**, **11**: 245-68, 1993.
- MONTENEGRO, J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. **Arq. Dermatol. Syphil.**, **13**:187, 1926.
- MROZEK, E.; ANDERSON, P.; CALIGIURI, M.A. Role of interleukin-15 in the development of human CD56 natural killer cells from CD34 hematopoietic progenitor cells. **Blood**, **87**: 2632-40, 1996.

- MUNGER, W.; DEJOY, S.Q.; JEYASEELAN SR., R.; TORLEY, L.W.; GRABSTEIN, K.H.; EISENMANN, J.; PAXTON, R.; COX, T.; WICK, M.M.; KERWAR, S.S. Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparasion with intrleukin-2. **Cell. immunol.**, **165**: 289-93, 1995.
- MURRAY, H.W. & HARIPRASHAD, J. Interleukin 12 is effctive treatment for an established systemic intracellular infection: experimental visceral leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, **181**: 387-91, 1995.
- NABORS, G.S.; AFONSO, L.C.C.; FARELL, J.P.; SCOTT, P. Switch from a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**: 3142-46, 1995.
- NISHIMURA, H.; HIROMATSU, K.; KOBAYASHI, N.; GRABSTEIN, K.H.; PAXTON, R.; SUGAMURA, K.; BLUESTONE, J.A.; YOSHIKAI, Y. IL-15 is a novel grow factor for murine $\gamma\delta$ T cells induced by *Salmonella* infection. **J. Immunol.**, **156**: 663-69, 1996.
- NOBEN-TRAUTH, N.; KROPPF, P.; MULLER, I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. **Science**, **271**: 987-90, 1996.
- OKAMURA, H.; TSUTSUI, H.; KOMATSU, T.; YATSUDO, M.; HAKURA, T.; TANIMOTO, T.; TORIGOE, K.; OKURA, T.; NUKADA, Y.; HATTORI, K.; AKITA, K.; NAMBA, M.; TANABE, F.; KONISHI, K.; FUKUDA, S.; KURIMOTO, M. Cloning a new cytokine that induces IFN- γ production by T-cells. **Nature**, **378**: 88-91, 1995.
- PATKI, A.H.; QUINONES-MATEU, M.E.; DORAZIO, D.; YEN-LIEBERMAN, B.; BOOM, W.H.; THOMAS, E.K.; LEDERMAN, M.M. Activation of antigen-induced lymphocyte proliferation by interleukin-15 without the mitogenic effect of

interleukin-12 that may induce human immunodeficiency virus-1 expression. **J. Clin. Invest.**, **98**: 616-21, 1996.

PERUSSIA, B.; CHAN SH; D'ANDREA, A.; TSUJI, K.; SANTOLI, D.; POSPISIL, M.; YOUNG, D.; WOLF, SF.; TRINCHIERI, G. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. **J Immunol**, **149**: 3495-502, 1992.

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEICAO-SILVA, F.; MODLIN, R.L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J. Clin. Invest.** **91**: 1390-95, 1993.

PRESKY, D.H.; MINETTI, L.J.; GILLESSEN, S.; WILKINSON, V.L.; WU, C.H.; GUBLER, U.; CHIZZONITE, R.G.; GATELY, M.K. Analysis of the Multiple Interactions Between IL-12 and the High Affinity IL-12 Receptor Complex. **J. Immunol.**, **160**: 2174-2179, 1998.

REINER, S.L. & LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annu. Rev. Immunol.** **13**: 151-77, 1995.

SAHA, B.; DAS, G.; VOHRA, H. GANGULY, N.K.; MISHRA, G.C. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on leishmania-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. **Eur. J. Immunol.**, **25**: 2492-98, 1995.

SALVUCCI, O.; MAMI-CHOUAIB, F.; MOREAU, J.L.; THEZE, J.; CHEHIMI, J.; CHOUAIB, S.; Diferencial regulation of interleukin-12 and interleukin-15-induced natural killer activation by interleukin-4. **Eur. J. Immunol.**, **26**: 2736-41, 1996.

SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L.C.C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **J. Immunol.**, **154**: 5320-30, 1995.

- SCOTT, P. The role of Th1 and Th2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, **68**: 369-72, 1989.
- SEDER, R.A.; GRABSTEIN, K.H.; BERZOFSKY, J.A.; MCDYIER, J.F. Cytokine interactions in human immunodeficiency virus-infected individuals: roles of interleukin (IL)-2, IL-12 and IL-15. **J. Exp. Med.**, **182**: 1067-78, 1995.
- SEDER, R. High-dose IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naive CD4 T cells for IFN- γ but have differential effects on priming for IL-4. **J. Immunol.**, **156**: 2413-22, 1996.
- SMITH, L.E.; RODRIGUES, M.; RUSSEL, D.G. The interaction between CD8+ cytotoxicity T cells and leishmania-infected macrophages. **J. Exp. Med.**, **174**: 499-505, 1991.
- SUNDAR, S.; REED, S.G.; SHARMA, S.; MEHROTRA, A.; MURRAY, H.W. Circulating T helper 1 (Th-1) and Th-2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **56**: 522-25, 1997.
- TRINCHIERI, G. & SCOTT, P. The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. **Imunol. Today.**, **15**: 460-63, 1994.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annu. Rev. Immunol.** **13**: 251-76, 1995.
- VASQUEZ, N.; WALSH, T.J.; FRIEDMAN, D.; CHANOCK, S.J.; LYMAN, C.A. Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, **66**: 145-50, 1998.

WARREN, H.; KINEAR, B.F.; KASTELEIN, R.L.; LANIER, L.L. Analysis of the costimulatory role of IL-12 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56^{dim}) human NK cells. **J. Immunol.**, **156**: 3254-59, 1996.

WHO. Homepage - <http://www.who.int/ctd/html/leisepidat.html>. 19/08/1998.

YOSHIMOTO, T.; WANG, C.R.; YONETO, T.; WAKI, S.; SUNAGA, S.; KOMAGATA, Y.; MITSUYAMA, M.; MIYAZAKI, J.I.; NARIUCHI, H. Reduced T Helper 1 Responses in IL-12 p40 Transgenic Mice. **J. Immunol.**, **160**: 588-594, 1998.

YE, W.; YOUNG, J.D.; LIU, C. Interleukin-15 induces the expression of mRNA of cytolytic mediators and augments cytotoxic activities in primary murine lymphocytes. **Cell. Immunol.**, **174**: 54-62, 1996.

9 APÊNDICES

Tabela A. Linfoproliferação em pacientes com LVA.

Resultados representados pela média das culturas triplicadas \pm desvio padrão.

	paciente1	paciente2	paciente3	paciente4	paciente7	paciente8	paciente9	paciente10
meio	190 \pm 16	245 \pm 8	106 \pm 11	166 \pm 10	60 \pm 2	211 \pm 30	128 \pm 71	138 \pm 6
Ag	229 \pm 30	285 \pm 32	101 \pm 22	143 \pm 45	75 \pm 15	10152 \pm 186	80 \pm 19	163 \pm 50
IL-15 (1,0)	198 \pm 27		141 \pm 4	160 \pm 7	903 \pm 63	2221 \pm 316	2184 \pm 400	3618 \pm 404
IL-15 (2,5)	—					9300 \pm 622	22326 \pm 2807	17487 \pm 1877
IL-15 (5)	236 \pm 39		513 \pm 56	1872 \pm 50	5750 \pm 389	17267 \pm 865	66333 \pm 3343	31618 \pm 5725
IL-15 (10)	61995 \pm 2295	—	1914 \pm 253	6528 \pm 239				
Ag+IL-15(1)	195 \pm 21	8618 \pm 893	85 \pm 14	161 \pm 21	725 \pm 27	19172 \pm 2820	88 \pm 38	360 \pm 85
Ag+IL-15(2,5)	—	38574 \pm 170				18844 \pm 1414	151 \pm 62	1661 \pm 444
Ag+IL-15(5)	223 \pm 12	60325 \pm 1663	313 \pm 65	1282 \pm 175	4363 \pm 568	35613 \pm 1638	573 \pm 125	5339 \pm 393
Ag+IL-15(10)	39673 \pm 684		1375 \pm 330	4865 \pm 876				
IL-12 (5)	—				264 \pm 377		305 \pm 155	172 \pm 87
Ag+IL-12(5)	289 \pm 29	940 \pm 148	147 \pm 44	3264 \pm 170	173 \pm 86	23797 \pm 3389	65 \pm 15	137 \pm 78
Ag+IL-15+IL-12	—				2384 \pm 35	30141 \pm 5280	339 \pm 120	412 \pm 24
PWM	33915 \pm 3685	69476 \pm 4581	295 \pm 81	1849 \pm 487	326 \pm 23	4947 \pm 938	40292 \pm 4530	27984 \pm 4530

	paciente 11	paciente 12	paciente 13	paciente 14	paciente 15	paciente 16	paciente 17	paciente 18	paciente 19
meio	119 \pm 18	828 \pm 119	85 \pm 24	341 \pm 17	134 \pm 47	221 \pm 63	157 \pm 34	1109 \pm 139	142 \pm 163
Ag	4025 \pm 349	423 \pm 69	126 \pm 37	984 \pm 35	188 \pm 56	165 \pm 20	1501 \pm 513	4653 \pm 441	1523 \pm 861
IL-15 (1,0)	1372 \pm 286	4811 \pm 502	665 \pm 247	7266 \pm 937	4744 \pm 412	1662 \pm 515		1384 \pm 585	618 \pm 67
IL-15 (2,5)	11340 \pm 260	28130 \pm 3062	12346	15954 \pm 445	—			2883 \pm 1056	
IL-15 (5)	32782 \pm 1572	49905 \pm 3281	—	40875 \pm 666	—				
IL-15 (10)	—			63284 \pm 700	—				
Ag+IL-15(1)	34595 \pm 9145	4819 \pm 920	2589 \pm 1334	7744 \pm 1148	6573 \pm 1493	2201 \pm 107		9409 \pm 2375	2075 \pm 55
Ag+IL-15(2,5)	14595 \pm 1628	26706 \pm 1923	16676 3225	23720 \pm 5482	—			13527 \pm 2333	—
Ag+IL-15(5)	28241 \pm 4659	54327 \pm 4210	—	40428 \pm 1724	—				
Ag+IL-15(10)	—			63496 \pm 1186	—				
IL-12 (5)	330 \pm 115			1159 \pm 244	243 \pm 103			4368 \pm 655	87 \pm 19
Ag+IL-12(5)	519 \pm 253			2226 \pm 470	607 \pm 235			6980 \pm 431	2918 \pm 418
Ag+IL-15+IL-12	118 \pm 36			19345 \pm 1628	3319 \pm 1330	1003 \pm 132		17391 \pm 2442	4895 \pm 675
PWM	1876 \pm 1071	60000		81324 \pm 4674	56262 \pm 8621	26362 \pm 3245	11345 \pm 1045	14562 \pm 923	12222 \pm 2426

Tabela B. Linfoproliferação em controles normais.Resultados representados pela média das culturas triplicadas \pm desvio padrão.

	controle1	controle2	controle3	controle4	controle5	controle6	controle7	controle8
meio	170 \pm 23	305 \pm 95	306 \pm 52	117 \pm 13	77 \pm 15	187 \pm 67	645 \pm 121	134 \pm 43
Ag	341 \pm 8	398 \pm 12	318 \pm 66		186 \pm 81	81 \pm 11	834 \pm 85	109 \pm 5
IL-15 (1,0)	3214 \pm 296	1048 \pm 158	491 \pm 445	3492 \pm 558	2453 \pm 364	–	827 \pm 60	1714 \pm 376
IL-15 (2,5)	9656 \pm 748	3050 \pm 95		33217 \pm 6760	10775 \pm 2971	–		
IL-15 (5)	16656 \pm 681	1463 \pm 695	292 \pm 108	55380 \pm 4065	20816 \pm 1796	–	6144 \pm 2826	–
IL-15 (10)	–		31805 \pm 7051	–	23922 \pm 1584	–	9797 \pm 598	–
Ag+IL-15(1)	6938 \pm 235	1558 \pm 1050	957 \pm 150	9110 \pm 1990	2598 \pm 651	647 \pm 92	833 \pm 264	2226 \pm 144
Ag+IL-15(2,5)	14206 \pm 1257	680 \pm 293		25057 \pm 3287	8940 \pm 1991	–	4749 \pm 1338	–
Ag+IL-15(5)	20263 \pm 125 2	–	271 \pm 68	66908 \pm 148 69	18009 \pm 1374	12607 \pm 810	15328 \pm 3893	–
Ag+IL-15(10)	–		23745 \pm 1262	–	19554 \pm 3567	24548 \pm 2221	–	
IL-12 (5)	–	960 \pm 238	–	288 \pm 178	293 \pm 65			77 \pm 12
Ag+IL-12(5)	4017 \pm 1043	1463 \pm 695	647 \pm 304	503 \pm 478	596 \pm 348	172 \pm 91	6598 \pm 1229	117 \pm 33
Ag+IL-15+IL-12	35091 \pm 3972	4832 \pm 1052	–		16550 \pm 964			980 \pm 204
PWM	41163 \pm 4029	326 \pm 81	16117 \pm 1481	8714 \pm 1042	73608 \pm 7147	13561 \pm 3268	2588 \pm 1462	19813

Tabela C. Linfoproliferação em pacientes com LCM.Resultados representados pela média das culturas triplicadas \pm desvio padrão.

	Paciente1	Paciente2	Paciente3	Paciente4	Paciente5	Paciente6	Paciente7	Paciente8	Paciente9
meio	147 \pm 26	1892 \pm 1056	3298 \pm 2863	283 \pm 198	350 \pm 76	120 \pm 37	314 \pm 160	226 \pm 103	306 \pm 166
Ag	5582 \pm 140	2977 \pm 197	7750 \pm 57375	15052 \pm 1982	11820 \pm 928	12207 \pm 1966	87446 \pm 4832	44470 \pm 2978	1165 \pm 602
ag+aIL-12(5)	1026 \pm 248	140 \pm 33	15875 \pm 2915	10373 \pm 2497	12604 \pm 1560	--	83682 \pm 4798	50889 \pm 4539	--
ag+aIL-12(10)	403 \pm 105	180 \pm 13	7128 \pm 755	9611 \pm 3593	13549 \pm 1714	--	97244 \pm 15557	51820 \pm 5431	--
ag+aIL-15(5)	2922 \pm 1502	1613 \pm 371	74447 \pm 24311	11199 \pm 989	10844 \pm 137	6523 \pm 219	86393 \pm 3910	48729 \pm 741	1500 \pm 50
ag+aIL-15(10)	1367 \pm 131	240 \pm 155	61598 \pm 4775	10959 \pm 1661	13310 \pm 1563	6150 \pm 1626	111572 \pm 21674	55623 \pm 4825	1484 \pm 2244
ag+iL-2+iL-15	485 \pm 119	256 \pm 6	15553 \pm 2915	9469 \pm 573	12229 \pm 843	--	88764 \pm 7118	49051 \pm 3681	--
PWM	22813 \pm 1550	7560 \pm 1206	48440 \pm 8898	26282 \pm 3139	18750 \pm 568	8671 \pm 1903	28687 \pm 2139	19488 \pm 754	20953 \pm 1672

	Paciente 10	Paciente 11	Paciente 12	Paciente 13	Paciente 14	Paciente 15	Paciente 16	Paciente 17	Paciente 18
meio	1012 \pm 169	152 \pm 73	1039 \pm 1301	65 \pm 20	163 \pm 41	197 \pm 18	70 \pm 14	128 \pm 36	678 \pm 539
Ag	1773 \pm 990	332 4 \pm 561	16152 \pm 1092	10834 7 \pm 1452	43619 \pm 12685	12089 \pm 62 2	17742 \pm 1619	36900 \pm 2109	37002 \pm 6518
ag+aIL-12(5)	--	--	--	--	32427 \pm 1923	8981 \pm 3360	32265 \pm 13 27	35158 \pm 8218	18418 \pm 405
ag+aIL-12(10)	--	--	--	--	27151 \pm 7969	4477 \pm 2021	23007 \pm 472	31758 \pm 5209	12974 \pm 2715
ag+aIL-15(5)	1865 \pm 2254	2188 \pm 785	39671 \pm 2535	106655 \pm 15583	7726 \pm 2344	9202 \pm 6371	24282 \pm 2799	33251 \pm 7749	44852 \pm 7138
ag+aIL-15(10)	1385 \pm 1546	2539 \pm 288	57892 \pm 1224	92361 \pm 5128	3466 \pm 393	6016 \pm 2790	25695 \pm 1066	39699 \pm 1563	29255 \pm 3760
ag+iL-2+iL-15	--	--	--	--	9975 \pm 1072	5807 \pm 1137	26109 \pm 1886	38217 \pm 3504	17388 \pm 2947
PWM	20186 \pm 3681	34215 \pm 1638	28847 \pm 2495	27737 \pm 2560	27673 \pm 3271	57770 \pm 894	39260 \pm 3980	39221 \pm 1549	48509 \pm 5466