



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**INDIVÍDUOS NÃO EXPOSTOS À *LEISHMANIA* DIFEREM
NA RESPOSTA IMUNE INICIAL AO PARASITO,
IN VITRO E IN VIVO.**

MARGARIDA MARIA DE LIMA POMPEU

**Salvador - Bahia - Brasil
2001**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**INDIVÍDUOS NÃO EXPOSTOS À *LEISHMANIA* DIFEREM
NA RESPOSTA IMUNE INICIAL AO PARASITO,
IN VITRO E IN VIVO.**

MARGARIDA MARIA DE LIMA POMPEU

ORIENTADOR: Manoel Barral-Netto

Tese apresentada para a obtenção
do grau de Doutor em Patologia
Humana

**Salvador-Bahia
2001**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

P788i Pompeu, Margarida Maria de Lima
Indivíduos não expostos à *leishmania* diferem na resposta imune inicial
ao parasito, in vitro e in vivo. [manuscrito] / Margarida Maria de Lima Pompeu.
- 2001.
116 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina.
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2001.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Barral-Netto. Laboratorio de Imunoregulação e
Microbiologia.

1. Leishmania 2. *Leishmania amazonensis*. 3. Citocinas. 4. Imunidade. I. Título.

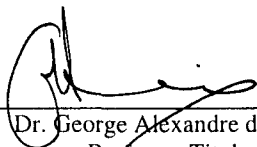
CDU 616.993.161:577.27

Indivíduos não expostos a Leishmania diferem na resposta imune inicial, *In Vitro* e *In Vivo*

MARGARIDA MARIA DE LIMA POMPEU

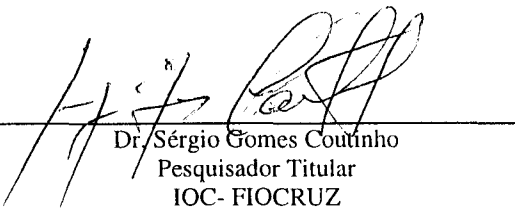
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

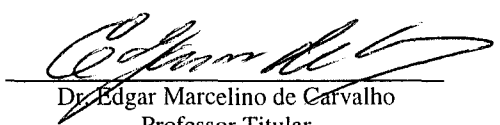


Dr. George Alexandre dos Reis
Professor Titular

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ



Dr. Sérgio Gomes Coutinho
Pesquisador Titular
IOC- FIOCRUZ



Dr. Edgar Marcelino de Carvalho
Professor Titular
FAMED - UFBA



Dr. Lain C. Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Manoel Barral-Netto
Professor Titular
FAMED - UFBA

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 O AGENTE ETIOLÓGICO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	17
1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	18
1.2.1 Infecção assintomática e Leishmaniose oligossintomática	18
1.2.2 Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL).....	18
1.2.3 Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM).....	19
1.2.4 Leishmaniose Cutânea Disseminada.....	19
1.2.5 Leishmaniose Cutânea Difusa.....	20
1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	20
1.3.1 Eventos Iniciais da Infecção por <i>Leishmania</i>	22
1.3.2 Diferenciação Funcional em resposta tipo Th1 ou Th2.....	24
1.3.2.1 A resposta imune na leishmaniose tegumentar humana.....	29

1.4.	VACINAÇÃO NA LEISHMANIOSE.....	33
1.5	SENSIBILIZAÇÃO IN VITRO.....	35
2	OBJETIVOS.....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3	JUSTIFICATIVA	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	VOLUNTÁRIOS SADIOS	40
4.2	CRITÉRIO DE EXCLUSÃO.....	40
4.3	PARASITO E ANTÍGENO.....	41
4.4	INTRADERMO-REAÇÃO DE MONTENEGRO.....	41
4.5	DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>LEISHMANIA</i>	42
4.6	DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA.....	42
4.7	SISTEMA DE SENSIBILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> (SSIV) DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO COM <i>L.</i> <i>AMAZONENSIS</i>	43
4.8	ANTICORPOS.....	45
4.9	MARCAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS E DE ATIVAÇÃO CELULAR	45
4.10	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS DO SOBRENADANTE DAS CULTURAS	46
4.11	MARCAÇÃO DE CITOCINAS INTRACELULARES NO SSIV.....	46
4.12	BLOQUEIO DE CITOCINAS NO SSIV.....	47
4.13	VACINAÇÃO CONTRA LEISHMANIOSE.....	47

4.14	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PRÉ E PÓS-VACINAÇÃO.....	48
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5	RESULTADOS.....	49
5.1	PADRONIZAÇÃO DO SSIV DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO COM <i>L. AMAZONENSIS</i>	49
5.1.1	Avaliação da resposta a diferentes tipos de antígeno de <i>Leishmania</i>.....	49
5.1.2	Determinação da melhor concentração do antígeno e cinética do crescimento celular	50
5.1.3	Avaliação da melhor concentração celular e do número de ciclos de estimulação.....	50
5.2	RESPOSTA IMUNE A <i>L. ANAZONENSIS</i> NO SSIV	53
5.2.1	Avaliação da produção de IFNγ.....	54
5.2.2	Avaliação da produção de outras citocinas.....	56
5.2.3	Avaliação das subpopulações linfocitárias	57
5.3	RESPOSTA IMUNE PÓS-VACINAÇÃO COM <i>L. AMAZONENSIS</i>	58
5.3.1	Análise da produção de IFN-γ	59
5.3.2	Análise das outras citocinas.....	59
5.3.3	Sub-populações linfocitárias.....	61
5.3.4	IDRM após vacinação contra leishmaniose.....	63
5.4	COMPARAÇÃO DAS RESP. IMUNES: SENSIBILIZAÇÃO IN VITRO VERSUS PÓS-VACINAÇÃO.....	64

5.5	AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE INICIAL HUMANA CONTRA <i>LEISHMANIA</i>	65
5.5.1	Marcadores de ativação celular, após sensibilização in vitro	65
5.5.2	Marcadores de ativação celular após vacinação contra leishmaniose	69
5.5.2.1	<u>Primeira avaliação : 40 dias pós-vacinação</u>	69
5.5.2.2	<u>Segunda avaliação: 6 meses pós-vacinação</u>	73
5.5.3	Bloqueio de citocinas no ensaio in vitro	73
5.5.4	Produção de citocinas intracelulares	75
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÕES	92
8	REFERÊNCIAS.BIBLIOGRÁFICAS	93
9	ANEXOS	106
9.1	Termo de Compromisso.....	106
9.2	Resultado da IDRM e da Concentração de IFN γ nos Sobrenadantes de MSP de Indivíduos com 40 Dias Pós-Vacinação contra <i>Leishmania</i>	108
9.4	Produção de IFN- γ (pg/10 ⁶ cels.) por CMSP de Indivíduos RR ou RL, durante os Dois Ciclos de Sensibilização in Vitro com Promastigotas Vivas de <i>L. amazonensis</i>	110
9.5	Produção de TNF- α (pg/10 ⁶ cels.) por CMSP de Indivíduos RR ou RL, durante os Dois Ciclos de Sensibilização in Vitro com Promastigotas Vivas de <i>L. amazonensis</i>	111
9.6	Produção de IL-10 (PG/10 ⁶ CELS.) por CMSP de Indivíduos RR ou RL, durante os Dois Ciclos de Sensibilização in Vitro com Promastigotas Vivas de <i>L.</i>	

	<i>amazonensis</i>	112
9.7	Produção de IL-5 (pg/10 ⁶ cels.) por CMSP de indivíduos RR ou RL, durante os dois ciclos de sensibilização in vitro com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i>	113
9.8	Produção de IFN- γ (pg/10 ⁶ cels.) por CMSP, após Estimulação com Promastigotas Vivas de <i>L. amazonensis</i> , em Indivíduos RR ou RL, com 40 Dias ou 6 Meses Pós-Vacinação contra Leishmaniose.....	114
9.9	Produção de TNF- α (pg/10 ⁶ cels.) por CMSP, após Estimulação com Promastigotas Vivas de <i>L. amazonensis</i> , em Indivíduos RR ou RL, com 40 Dias e 6 Meses Pós-Vacinação contra Leishmaniose.....	115
9.10	Produção de IL-10 (pg/10 ⁶ cels.) por CMSP, após Estimulação com Promastigotas Vivas de <i>L. amazonensis</i> , em Indivíduos RR ou RL, com 40 Dias e 6 Meses Pós-Vacinação contra Leishmaniose.....	116
9.11	Produção de IL-5 (pg/10 ⁶ cels.) por CMSP, após Estimulação com Promastigotas Vivas de <i>L. amazonensis</i> , em Indivíduos RR ou RL, com 40 Dias e 6 Meses Pós-Vacinação contra Leishmaniose.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

B7	Molécula co-estimulatória
CAA _g	Célula apresentadora de antígeno
CMSP	Células mononucleadas do sangue periférico
CPH	Complexo principal de histocompatibilidade
CR3	Receptor do complemento 3
Fc γ R	Receptor γ da porção Fc de imunoglobulina
HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR, do complexo principal de histocompatibilidade
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IDRM	Intradermo-reação de Montenegro
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa

LPS	Lipopolissacaridio
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos
MIP-1 α	Proteína inflamatória do macrófago
NO	Óxido nítrico
RC	Receptor de complemento
RFc γ	Receptor da fração Fc de IgG
RL	Respondedor lento
RR	Respondedor rápido
TNFRp55	Receptor de TNF p55
SBF	Soro bovino fetal
STF	Salina tamponada com fosfatos
TGF- β	Fator transformador do crescimento- β
Th	Linfócito T <i>helper</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alpha

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Protocolo adotado para sensibilização in vitro de CMSP de indivíduos saudáveis, com promastigotas vivas de *L. amazonensis* 44
- Figura 2. Sensibilização in vitro de CMSP com *Leishmania*: padronização do número de ciclos de estimulação e do número de células 52
- Figura 3. Sensibilização in vitro de CMSP com *Leishmania*: padronização do tipo de antígeno. A. Curva dose-resposta linfoproliferativa; B. Produção de IFN γ ; C e D. Cinética da proliferação celular com diferentes concentrações do antígeno: primeiro e segundo ciclos de sensibilização 53
- Figura 4. Sensibilização in vitro de CMSP com *Leishmania*: Cinética da secreção de IFN γ , no início e no final da sensibilização. A. Todos indivíduos; B. Altos e baixos-respondedores; C. Altos-respondedores; D. Baixos - respondedores 55
- Figura 5. Sensibilização in vitro de CMSP com *Leishmania*: Perfil de algumas citocinas produzidas nos sobrenadantes de CMSP de indivíduos alto ou baixo-responder, no início e final da sensibilização in vitro com *L. amazonensis*. A. IFN γ ; B. TNF α ; C. IL-10; D. IL-5 57
- Figura 6. Produção de citocinas nos sobrenadantes de culturas de CMSP estimuladas com *Leishmania*, de indivíduos vacinados contra leishmaniose, nas avaliações pré e pós-vacina. A. IFN γ ; B. TNF α ; C. IL-10; D. IL-5 60
- Figura 7. Sub-populações de linfócitos, ex-vivo, antes e após 40 dias de vacinação. A e B. RR; C e D. RL 62

- Figura 8. Freqüência das sub-populações de células T CD4⁺, CD8⁺, de indivíduos vacinados contra leishmaniose, após re-estimulação *in vitro* com *L. amazonensis*,. A. Com 40 dias pós-vacina; B. Com 6 meses pós-vacina 62
- Figura 9. Resultado da Intradermo-reação de Montenegro, realizada com 40 dias pós-vacina, em RR ou RL 63
- Figura 10. Quantificação de anticorpos séricos antígeno-específicos, por ELISA, em RR ou RL, antes e após vacinação 66
- Figura 11. Correlação linear entre os *ranks* de citocinas produzidas após sensibilização *in vitro*, com os das produzidas após 40 dias de vacinação. A. IFN γ ; B. TNF α ; C. IL-5; D. IL-10 66
- Figura 12. Ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ nos dois grupos de respondedores rápidos ou lentos, no início e final da sensibilização *in vitro*. A. CD4⁺25⁺; B. CD4⁺71⁺; C. CD8⁺25⁺; D. CD8⁺71⁺ 67
- Figura 13. Comportamento da ativação de linfócitos T, manifesta pela expressão de CD25, antes e após a sensibilização *in vitro*. A. T CD4⁺ em RR; B. T CD4⁺ em RL; C. T CD8⁺ em RR; D. T CD8⁺ em RL 68
- Figura 14. Comportamento da ativação de linfócitos T, manifesta pela expressão de CD71, antes e após a sensibilização *in vitro*. A. T CD4⁺ em RR; B. T CD4⁺ em RL; C. T CD8⁺ em RR; D. T CD8⁺ em RL 70
- Figura 15. Ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ nos dois grupos, respondedores rápidos ou lentos, com 40 dias pós-vacina. A. CD4⁺25⁺; B. CD4⁺71⁺; C. CD8⁺25⁺; D. CD8⁺71 70-

- Figura 16. Avaliação com 40 dias pósvacina. Comportamento da ativação de linfócitos T, manifesta pela expressão de CD25, . A. T CD4+ em RR; B. T CD4+ em RL; C. T CD8+ em RR; D. T CD8+ em RL 71
- Figura 17. Avaliação com 40 dias pósvacina. Comportamento da ativação de linfócitos T, manifesta pela expressão de CD71. A. T CD4+ em RR; B. T CD4+ em RL; C. T CD8+ em RR; D. T CD8+ em RL 72
- Figura 18. Ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ nos dois grupos, após estimulação in vitro com promastigotas vivas, RR ou RL, com 6 meses pós-vacina. A. CD4⁺25⁺; CD4⁺71⁺; B. CD8⁺25⁺; CD8⁺71 72
- Figura 19. Frequência de resposta com aumento da produção de IFN- γ , frente ao bloqueio de IL-4, IL-10 ou TGF β , em culturas de CMSP de voluntários RL, sensibilizadas in vitro com *L. amazonensis*, na primeira estimulação 75
- Figura 20. Resposta, com produção de IFN- γ , ao bloqueio de IL-4 ou de IL-10 ou de TGF β , em culturas de CMSP, de indivíduos RL sensibilizados in vitro com *L. amazonensis*, tratadas com anticorpos neutralizantes (10 μ g/ml), no primeiro ciclo de sensibilização. A. anti-IL-4; B. anti-IL-10; C. anti-TGF- β 76
- Figura 21. Resposta de CMSP de voluntários RL ao bloqueio de IL-4 ou de IL-10 ou de TGF β , expressa pelo aumento da produção de IFN- γ , em relação ao controle com anticorpo isotipo, em culturas de CMSP sensibilizadas, in vitro com *L. amazonensis*, e tratadas com anticorpos neutralizantes, no primeiro ciclo de sensibilização. A. 77

Figura 22. Efeito do bloqueio realizado no primeiro ciclo de sensibilização sobre a diferenciação linfocitária, no segundo ciclo. Linfócitos cultivados com anticorpos bloqueadores foram estimulados com *Leishmania* no segundo ciclo, na presença ou ausência de anticorpos bloqueadores; 77

Figura 23. Produção de IFN- γ e IL-10 intracelulares em linfócito CD4+ e CD8+, de voluntários RR, com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, no segundo ciclo de sensibilização in vitro. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Fenótipo de indivíduos sadios. MSP exvivo e após sensibilização *in vitro* com

L. amazonensis..... 58

RESUMO

INDIVÍDUOS NÃO EXPOSTOS À *LEISHMANIA* DIFEREM NA RESPOSTA IMUNE INICIAL, IN VIVO E IN VITRO. MARGARIDA MARIA DE LIMA POMPEU. Na leishmaniose, o estabelecimento da infecção depende da resposta imunológica do hospedeiro, principalmente dos eventos iniciais da interação do parasito com o hospedeiro. Na infecção humana, os eventos iniciais não podem ser estudados tanto por restrições éticas, como por não ser possível definir o momento em que ocorreu a inoculação da *Leishmania*. Neste trabalho, foram avaliados os eventos iniciais da resposta imune humana à *L. amazonensis*, através da sensibilização in vitro de CMSP com promastigotas vivas de indivíduos sadios, sem exposição prévia à *Leishmania*. Os mesmos voluntários foram submetidos à vacinação contra *L. amazonensis* com uma vacina monocepa produzida pela BIOBRAS. CMSP de 32 voluntários de indivíduos sadios foram sensibilizadas in vitro com promastigotas vivas, e, em diferentes momentos, foram determinadas as concentrações de citocinas nos sobrenadantes das culturas e o fenótipo das células. Após a vacinação, com 40 dias ou seis meses, foram avaliados a resposta imune e o fenótipo das subpopulações de linfócitos. Tanto na avaliação pré vacina, como na de 40 dias pós vacina, foi possível observar dois tipos de resposta: uma com produção de IFN- γ em concentrações elevadas, constituída por 50% dos voluntários, e a outra com baixa ou sem produção de citocinas. Neste momento, a produção elevada de IFN- γ , no primeiro grupo, estava associada a concentrações também elevadas de TNF- α e de IL-10, enquanto que, no outro grupo, a concentração destas citocinas eram baixas ou ausentes. Entretanto, com 6 meses pós-vacinação, todos os indivíduos vacinados apresentavam grande produção de IFN- γ , após estimulação in vitro com *Leishmania*, em concentrações semelhantes às dos que a produziam desde o início. Ambos grupos apresentavam TNF- α e IL-10 em baixas concentrações e aumentaram a produção de IL-5, sugerindo uma modulação da resposta tipo Th1 por linfócitos Th2. Foi evidenciado, também, que os linfócitos T CD8⁺ parecem exercer papel importante nos eventos iniciais, possivelmente contribuindo para o *booster* da produção inicial de IFN- γ e/ou modulando a resposta, através da produção de IL-10. A supressão inicial, observada nos voluntários com resposta lenta, parece ser multifatorial, e, aparentemente IL-10, IL-4 e TGF- β têm pouca participação nesta modulação. Houve uma correlação positiva significativa para todas as citocinas da resposta in vitro, com a da resposta pós vacina inicial, com 40 dias, sugerindo que o sistema de sensibilização in vitro, utilizado neste estudo, tem a capacidade de prever a resposta de sensibilização pós vacinação. Isto indica que este sistema de sensibilização in vitro significa um importante instrumento no estudo da imuno-regulação da leishmaniose e na triagem de antígenos para vacina.

PALAVRAS CHAVES: *Leishmania*. *Leishmania amazonensis*. Citocinas. Imunidade

ABSTRACT

NON EXPOSED INDIVIDUALS DIFER IN THEIR INITIAL IMMUNE RESPONSE, IN VIVO AND IN VIVO. **MARGARIDA MARIA DE LIMA POMPEU.** In leishmaniasis the outcome of infection is highly dependent on the host immunological response most likely determined during the initial contact of host cells and *Leishmania*. Early steps of human leishmaniasis cannot be examined *in vivo* due to ethical constraints. Herein, an *in vitro* priming system (PIV) was established to investigate early human immune response to *Leishmania amazonensis*, an agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. Thirty-two healthy volunteer's blood were collected to priming *in vitro* with *L. amazonensis* promastigotes and the same volunteers have been submitted to vaccination against *L. amazonensis* (BIOBRAS) and had their responses evaluated both at 40 days and 6 months post vaccination. Already at the pre-vaccine evaluation or even after priming *in vitro* or 40 days post-vaccination it is possible to distinguish two type of response: one with high production of IFN- γ and other with low or no production. At this moment, the high amount of IFN- γ was associated with high production of IL-10 and TNF- α , while the low IFN- γ -responders produced low amount of these cytokines. At the 6 months post-vaccination evaluation, however, all tested individuals were producing similarly high levels of IFN- γ upon stimulation of their PBMC with *Leishmania* promastigotes. Both groups produced low amount of IL-10 and TNF- α and increased the production of IL-5, suggesting a Th2 immuno modulation. It was shown that CD8⁺ cells might play an important role during the initial events. There was a significant correlation of primed *in vitro* response with the first post-vaccination evaluation. Such findings suggest that PIV responses are able to predict the early post-vaccination responses of tested volunteers, and it is an important instrument to study of initial human response against *Leishmania* and to screening antigen for vaccine. The results also indicate that all vaccinated individuals eventually mount a potent anti-*Leishmania* CMI response. The difference in vaccinated individuals is more on the pace the CMI response is mounted than on the level of response achieved. PIV system may be na important instrument for antigen screening in vaccine studies.

KEY WORDS: *Leishmania*. *Leishmania amazonensis*. Citocinas. Immunity.

1 INTRODUÇÃO

1.1. O AGENTE ETIOLÓGICO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*). Estes protozoários causam doenças tegumentar ou visceral. O parasito pode ocorrer sob duas formas evolutivas: a promastigota e a amastigota. A forma promastigota é flagelada, vive em meio extracelular, no trato digestivo dos vetores, flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (LEWIS & WARD, 1987). A forma amastigota é encontrada parasitando predominantemente células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros mamíferos (MOLYNEUX & KILLICK-KENDRICK, 1987). No Novo Mundo as espécies responsáveis pela leishmaniose tegumentar são: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania colombiense*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania mexicana* (GRIMALDI & TESH, 1993). As descritas no Velho Mundo são: *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica* (ASHFORD & BETTINI, 1987).

A leishmaniose é endêmica em 88 países da África, Ásia, Europa e Américas do Sul e do Norte. Estima-se que 12 milhões de indivíduos estejam infectados com *Leishmania*, com a ocorrência de 1,5 a 2 milhões de casos novos/ano, e que 350 milhões de indivíduos correm risco de se infectar (WHO, 2000). No Brasil, a distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar é ampla e, com exceção do Rio Grande do Sul, a doença tem sido registrada em todo o território nacional. Sua incidência é alta, e, em surtos epidêmicos, como em 1995, a ocorrência de casos novos chega a exceder 35.000 casos/ano, no país. Em 1998 foram notificados 12.069 casos novos, sendo aproximadamente 40

% deles situados na região nordeste, acometendo principalmente os estados do Maranhão, Ceará e Bahia (MS-FNS, 1998).

1.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Na leishmaniose tegumentar observam-se diversos quadros clínicos, com patogênese e prognóstico diferentes, que variam desde a cura espontânea à quadro com lesões muito destrutivas ou formas anérgicas, resistentes ao tratamento.

1.2.1 Infecção Assintomática e Leishmaniose Oligossintomática

São observadas em indivíduos de área endêmica de leishmaniose que apresentam intradermo-reação de Montenegro (IDRM) e resposta linfoproliferativa a antígenos de *Leishmania* positivas, com produção de IFN γ , sem história prévia de leishmaniose (GUERRA e cols., 1985; MAASHO e cols., 1998; POMPEU MML, dados não publicados). Admite-se que ocorra infecção assintomática ou com manifestação discreta, que passa despercebida, ocorrendo controle da infecção sem tratamento.

1.2.2 Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)

É caracterizada pela presença de lesão única, embora parte dos pacientes possa apresentar lesões múltiplas nas áreas expostas, decorrentes possivelmente de picadas múltiplas do vetor (PEARSON & SOUSA, 1995). Pode haver comprometimento de linfonodos regionais (BARRAL A e cols., 1995a; SOUSA e cols., 1995), levando a um quadro de linfadenite granulomatosa (ROCHA, 1998), que geralmente antecede a lesão cutânea. A lesão cutânea inicial começa no local da picada do flebótomo, com eritema,

nódulo ou pápula, que ulcera no centro e apresenta bordas elevadas, bem delimitadas e com fundo granuloso. É menos freqüente a ocorrência de lesões vegetantes e verrucosas. A doença evolui cronicamente e tem tendência a apresentar cura espontânea (MARSDEN e cols., 1984; COSTA e cols., 1990; HERWALDT e cols., 1992).

1.2.3 Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM)

Aproximadamente 3% dos pacientes com infecção por *L. braziliensis* evoluem para a forma cutâneo-mucosa. O comprometimento da mucosa está geralmente associado a múltiplas ou extensas lesões acometendo a parte do corpo acima da cintura, assim como ao tratamento inadequado. É caracterizada por lesão na mucosa nasal, que pode expandir e acometer palato mole e duro, úvula, faringe, gengivas e lábio superior. O intenso infiltrado inflamatório resulta em um exuberante aumento do nariz e do lábio superior, conferindo à lesão um aspecto tumoral e desfigurante. A perfuração do septo nasal é observada em torno de 42% dos pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa. A doença pode afetar a mucosa traqueobrônquica e esôfago. A infecção bacteriana secundária, das vias aéreas superiores, e pneumonite, podem levar a um curso fatal (MARSDEN, 1986; WALTON, 1987; PEARSON & SOUSA, 1995).

1.2.4 Leishmaniose Cutânea Disseminada

Aproximadamente 1% dos pacientes com leishmaniose cutânea apresenta disseminação da lesão inicial, com formação de numerosas lesões pequenas, papulares ou acneiformes, chegando a atingir até 800 lesões espalhadas por todo o corpo, com algumas úlceras pequenas. Ocorre comprometimento de mucosas em 38% dos casos. A

disseminação rápida sem comprometimento dos linfonodos e a ocorrência de febre e calafrios sugerem que a disseminação seja hematogênica (COSTA e cols., 1986; CARVALHO e cols., 1994).

1.2.5 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

A doença começa com lesão única, que pode ser um nódulo ou placa. A seguir aparecem lesões satélites da manifestação inicial, que tendem a se disseminar por todo tegumento, sem acometer as vísceras. As lesões da mucosa são discretas e superficiais, sem dano tecidual como as observadas na forma cutâneo-mucosa. A doença pode manifestar-se com diferentes graus de comprometimento. A forma polar, não responsiva, caracteriza-se por não apresentar úlcera, ter curso lento e progressivo, com resposta imune anérgica (CONVIT & VEGAS, 1965; BRYCESON, 1969; SILVA, 1982). A forma subpolar apresenta alguns sinais de resposta imune e lise de parasito, como cura espontânea de lesões em algumas áreas do corpo (BARRAL e cols., 1995b; COSTA e cols., 1995). Ambas as formas são refratárias ao tratamento.

1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Os modelos de leishmaniose experimental têm contribuído muito para o esclarecimento da imuno-regulação da doença. Algumas linhagens de camundongos apresentam resistência completa ou parcial à infecção, outras são completamente susceptíveis. Camundongos das linhagens C3H e C56BL/6 infectados com *L. major* apresentam lesão inicial e controlam a infecção, com cura aparente. Camundongos BALB/c são altamente susceptíveis, neles a infecção progride rapidamente, com

visceralização do parasito, aumento progressivo da carga parasitaria e curso fatal (PRESTON & DUMONDE, 1976).

O controle da infecção é mediado pela imunidade celular tipo Th1 (SCOTT, 1991), e o tipo de resposta, a ser desenvolvida, parece ser determinado pela produção significativa de IL-12 nos momentos iniciais da infecção, que induz a resposta Th1 (SCOTT e cols., 1996), caracterizada pela secreção de IFN- γ e TNF- α (SCOTT e cols., 1988; SCOTT, 1991; REINER & LOCKSLEY, 1995). IFN γ leva à ativação de mecanismos microbicidas do macrófago, através da síntese de óxido nítrico (NO) (MURRAY e cols., 1983; LIEW e cols., 1990 b), de radicais livres derivados do oxigênio e síntese de maior número e quantidade de enzimas lisossomais. O TNF- α parece estar envolvido na indução da ativação de macrófagos, sinergizando com IFN- γ e estimulando-os a produzir NO (LIEW e cols., 1990 a; GREEN e cols., 1990; THEODOS e cols., 1991). Além disso, o TNF- α participa da modulação da resposta inflamatória, induzindo apoptose de células T no sitio de infecção. Camundongos sem receptor de TNF- α p55, embora consigam eliminar o parasito, não conseguem resolver a inflamação, que permanece com infiltrado linfocitário, possivelmente decorrente do defeito na indução de apoptose (VIEIRA e cols., 1996).

Os animais susceptíveis apresentam síntese de IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β , que inibem a proliferação de células Th1 e síntese de IL-12 e de IFN- γ . Assim, ocorrem expansão e predomínio de linfócitos Th2, com desativação do macrófago e proliferação do parasito (HEINZEL e cols., 1989; SCOTT e cols., 1989; LOCKLEY & SCOTT, 1991; BARRAL-NETTO e cols., 1992; MORRIS e cols., 1992; SCOTT, 1998).

As condições que desencadeiam a diferenciação Th1 ou Th2 parecem ser multifatoriais. Alguns destes fatores têm sido evidenciados, trazendo mais clareza para a compreensão da patogênese da leishmaniose, embora ainda existam muitas lacunas no

conhecimento. A imunidade inata desempenha papel importante (revisto em KEMP, 1997; BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1998), porque no período inicial ocorrem interações celulares que levam à produção do microambiente que induzirá a diferenciação linfocitária, definindo, assim, o tipo de resposta imune que será desenvolvida.

1.3.1 Eventos iniciais da infecção por *Leishmania*

Durante a picada do flebótomo, promastigotas, presentes nas glândulas salivares, são inoculadas junto com a saliva, no lago sanguíneo produzido pelo traumatismo da probóscide do flebótomo, na derme do hospedeiro mamífero (RIBEIRO, 1995). A quantidade de promastigotas inoculadas varia de acordo com a intensidade da infecção do flebótomo. O número de promastigotas inoculadas parece ser importante no desenvolvimento da resposta imune. Camundongos BALB/c, quando infectados com inóculo grande, desenvolvem resposta Th2, sem controle do crescimento parasitário e progressão da doença. Se infectados com baixo número de parasitos, apresentam controle da infecção (MENON & BRETSCHER, 1996), com desenvolvimento de resposta Th1 (DOHERTY & COFFMAN, 1996; MENON & BRETSCHER, 1998). Estima-se que os flebótomos podem inocular de 0 a 1000 promastigotas na derme do hospedeiro mamífero (WARBURG & SCHLEIN, 1986), o que possivelmente entra como um fator importante na variação da intensidade da infecção. Outros fatores relevantes são as substâncias presentes na saliva do flebótomo. (GILLESPIE e cols., 2000). Algumas delas podem interferir, induzindo resposta Th2 e exacerbação da lesão, mesmo em camundongos naturalmente resistentes (MBOW e cols., 1998; BELKAID e cols., 1998). Deve-se levar em conta, no entanto, que estes autores trabalharam com a glândula sonicada, o que acarreta na

introdução de um *pool* de moléculas provenientes de organelas e de membranas celulares, que normalmente não estão presentes na saliva, na infecção natural.

As formas metacíclicas são muito infectantes e relativamente resistentes à ação do complemento. Foi demonstrado que cinases proteicas, derivadas de *Leishmania*, que estão em maior concentração na fase de crescimento estacionária e nas formas metacíclicas, fosforilam alguns moléculas do complemento (C3, C5, C9), com subsequente inibição da via clássica e alternativa (revisto em BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1998). Além disso, pode ocorrer liberação espontânea de complexos C5-C9, da superfície de formas metacíclicas de *L. major* (PUENTES e cols., 1990). Esta liberação parece estar associada ao alongamento da cadeia de lipofosfoglicana (LPG) da superfície do parasito (revisto em BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1998). Além disso, cinases proteicas derivadas de *Leishmania*, que estão aumentadas nas formas metacíclicas, fosforilam vários componentes do complemento (C3, C5 e C9), com inibição subsequente das vias clássica e alternativa (revisto em BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1998), constituindo, assim, importantes mecanismos de escape da lise mediada pelo complemento.

Uma vez na derme, as promastigotas podem penetrar em neutrófilos, eosinófilos, macrófagos (POMPEU e cols., 1991; LIMA e cols., 1998 ou em células de Langerhans (NUTMAN e cols., 2000). Os neutrófilos e eosinófilos conseguem lisar as *Leishmanias* (POMPEU e cols., 1991; LIMA e cols., 1998). Embora elas consigam diferenciar-se em amastigotas e proliferar dentro de células dendríticas (NUTMAN e cols., 2000), os macrófagos são as células onde elas podem proliferar intensamente nos vacúolos parasitóforos (KONECNY e cols., 1999). Macrófagos ou células de Langerhans infectados migram para o linfonodo regional (MOLL e cols., 1993), mas, ainda na pele, estas células podem sofrer influências de quimiocinas ou citocinas liberadas por queratinócitos, neutrófilos, mastócitos e macrófagos presentes no sítio de inoculação. Quimiocinas e seus

receptores participam na regulação da migração e das interações das células apresentadoras de antígeno (CAAg) com os linfócitos. CCR2 é importante tanto na migração de células de Langerhans, como na localização de células dendríticas nas áreas T dos órgãos linfóides de camundongos, e conseqüentemente no desenvolvimento da resposta celular tipo Th1. Camundongos com ausência de CCR2, quando infectados com *L. major*, apresentam menor número de células dendríticas no baço e uma falha no seu direcionamento para as áreas T. Eles apresentam resposta Th2, embora tenham genótipo associado a resistência (SATO e cols., 2000). A IL-1, a IL-18 e o TNF- α também induzem a migração das células de Langerhans para o linfonodo (CUMBERBATCH e cols., 2001), enquanto que a IL-10 e MIP-1 α inibem sua migração para o linfonodo (ARNOLDI & MOLL, 1998; WANG e cols., 1999a, b).

Chegando no linfonodo, as células de Langerhans transformam-se em células dendríticas, que têm maior potencial de sensibilização que as demais CAAg. É no linfonodo que vai ocorrer a sensibilização dos linfócitos pelas CAAg (MOLL e cols., 1993). Diversas células, como as dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B, podem apresentar antígeno às células T, dando início à sensibilização e expansão das células efetoras. A diferenciação linfocitária vai depender, entre outros fatores, do tipo de CAAg, das moléculas coestimulatórias expressas e das quimiocinas e citocinas que predominam no micro-ambiente nestes primeiros momentos da sensibilização linfocitária.

1.3.2 Diferenciação Funcional em Resposta Tipo Th1 ou Th2.

Linfócitos T CD4⁺ virgens (Th0) transcrevem inicialmente IL-4 e IFN- γ . Após os primeiros dias de ativação, em função das citocinas predominantes no microambiente, ocorre a definição da diferenciação em Th1 ou Th2 (NAKAMURA e cols., 1997). Células

NK, NK-T, da resposta inata, participam neste momento inicial, secretando quantidades importantes de IFN- γ , que tem papel relevante na sensibilização de células Th1 (SCHARTON-KERSTEN & SCOTT, 1995). NK-T pode induzir células NK a proliferar (EBERL & MACDONALD, 2000), e se elas forem estimuladas por IL-12 e IL-18 podem produzir IFN- γ em concentrações elevadas (LAUWERYS e cols., 2000). O IFN- γ produzido inicialmente por estas células induz a produção de IL-12 por CCAg (células dendríticas, macrófagos, monócitos, linfócito B) e por polimorfonucleados. A iniciação da produção de IL-12 pode ser desencadeada pela fagocitose de parasito, de produtos bacterianos ou por componentes da matriz extracelular (SUTTERWALA & MOSSER, 1999) e amplificada pelo IFN- γ . A IL-12, por sua vez, amplifica a produção de IFN- γ , estabelecendo, assim, uma importante alça *feedback* positiva parácrina (BELOSEVIC e cols., 1989; HEINZEL e cols., 1995). A célula NK é considerada como a principal fonte de IFN- γ (SCHARTON-KERSTEN & SCOTT, 1995), mas parecem existir outras fontes alternativas desta citocina, nesta fase inicial, como NK-T (LAUWERYS e cols, 2000) e possivelmente T CD8+, como observado em infecção bacteriana (LERTMEMONGKOLCHAI e cols., 2001). Camundongos depletados de células NK (NK⁻T⁺) conseguem desenvolver resposta Th1 eficiente, com a produção de IL-12 e de IFN- γ , capazes de controlar a infecção por *L. major*, indicando que a IL-12 pode induzir desenvolvimento de resposta Th1, independentemente de células NK (SATOSKAR e cols., 1999), possivelmente pela ativação de NK-T.

A produção de IFN- γ , nos primeiros três dias de infecção, é crítica para a diferenciação de linfócitos Th0 em Th1 e para inibir diferenciação em Th2 (LEIBY e cols., 1993) e a CCAg desempenha papel crítico neste momento. A infecção de células de Langerhans com amastigotas, na presença de IFN- γ , induz sua ativação, ocorrendo aumento da expressão de moléculas do CPH classe I e II, de moléculas coestimulatórias

(CD40, CD54, CD80 e CD86) e de síntese de IL-12. Por outro lado, tem sido demonstrado que a infecção de macrófagos, tanto com amastigotas como com promastigotas, não induz ativação, nem secreção importante de IL-12 (REINER e cols., 1994; VON STEBUT e cols., 1998; MAROVICH e cols., 2000). É possível que o tipo de CAAg, se célula dendrítica ou macrófago, predominante no linfonodo, no momento da interação inicial com células T virgens, seja um fator determinante no tipo de resposta. Para que ocorra diferenciação de linfócitos Th1, parece ser necessário que aconteça sensibilização por células de Langerhans.

Além de estimular a resposta imune, nesta fase inicial, induzindo a produção de IL-12, células NK podem também inibir sua secreção, através da produção de interferon tipo I ($IFN\alpha/\beta$), num mecanismo de modulação da resposta inata (DIEFENBACH e cols., 1998). Embora em alguns sistemas, $IFN-\beta$ possa induzir macrófagos a produzir IL-12, (JIANG & DHIB-JALBUT, 1998 VAN WEYENBERGH e cols., 2001), em outros sistemas, ele pode influenciar a função das células dendríticas, diferenciando-as em tipo2, suprimindo a produção de IL-12 (BARTHOLOME e cols., 1999; MCRAE e cols., 2000; HUANG e cols., 2001) e induzindo a de IL-10 (HUANG e cols., 2001) e de IL-5 (BARTHOLOME e cols., 1999), limitando a expansão de resposta tipo Th1 e criando um ambiente permissivo para a tipo Th2. A inibição da produção de IL-12 pode ser também induzida por fosfoglicanas da *Leishmania*, como um mecanismo de escape do parasito (PIEDRAFITA e cols., 1999).

Outras citocinas, como $TNF-\alpha$, IL-1 β , IL-15 e IL-18, potenciam o efeito da IL-12 na indução de secreção de $IFN\gamma$ por células NK (SHER e cols., 1993; HUNTER e cols., 1995; FEHNIGER e cols., 1999; AKIRA, 2000), propiciando as condições necessárias para a proliferação das células Th1 efectoras.

Os dados aqui apresentados de modo simplificado representam apenas parte de uma complexa rede de interações entre citocinas, quimiocinas, seus respectivos receptores e moléculas co-estimulatórias, que agem induzindo a diferenciação e expansão de resposta Th1 e inibindo a de Th2. Com a produção aumentada de IFN- γ e de TNF- α , ocorre ativação de mecanismos microbicidas do macrófago, através da síntese de NO, de radicais livres derivados do oxigênio e de maior número e quantidade de enzimas lisossomais (NATHAN e cols., 1983; MAUEL e cols., 1991). Ocorre também a lise de macrófagos infectados, através de células NK ou de linfócito T CD8⁺ dependente de Fas (CONCEIÇÃO-SILVA e cols., 1998). Isto implica na redução da carga parasitária e no controle da infecção.

Embora o fenótipo Th2, associado com a susceptibilidade à infecção, seja caracterizado pela alta produção de IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (SCOTT P e cols, 1989; HEINZEL e cols., 1989; BARRAL-NETTO e cols., 1992; MORRIS e cols., 1992), ainda não estão bem definidas as condições que o desencadeiam. Um rápido aumento da expressão de RNAm de IL-4 é observado, com 16 h de infecção, no linfonodo de drenagem dos animais susceptíveis, que retorna a níveis basais, com 48 h, aumentando novamente a partir do 5º dia de infecção e permanecendo elevada ao longo da doença (HIMMELRICH e cols., 1999).

Diversas células podem participar na produção de IL-4 nestas primeiras horas de infecção. Neutrófilos (BRANDT e cols., 2000) e células T CD4⁺ NK1⁺ (VON DER WEID e cols., 1996; FLESCHE e cols., 1997; NOBEN-TRAUTH e cols., 2000) são capazes de secretar IL-4 e com isso modular a resposta para diferenciação tipo Th2 (TACCHINI-COTTIER e cols., 2000).

A IL-4 tem a capacidade de induzir secreção de proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), que atrai monócitos/macrófagos, que, se não ativados, podem ser

células permissivas para a *Leishmania*, favorecendo o crescimento do parasito. A IL-4 pode também inibir a migração de células de Langerhans para o linfonodo. Esta inibição ocorre através da redução da expressão de receptor de TNF- α II (TAKAYAMA e cols., 1999). Esta ação da IL-4 é potencializada pela ação da IL-10, que também inibe a migração das células de Langerhans, através da supressão da produção de IL-1 e TNF- α (WANG e cols., 1999). Se células de Langerhans não chegam ao linfonodo, os linfócitos serão então sensibilizados predominantemente por macrófagos e células B. Como mencionado acima, macrófagos infectados, tanto com amastigotas como com promastigotas, não expressa adequadamente moléculas do CPH classe I e II, nem moléculas coestimulatórias e não são capazes de sintetizar IL-12 (VON STEBUT e cols., 1998; MAROVICH e cols., 2000). Esta inibição pode estar relacionada ao modo de penetração da *Leishmania* no macrófago. *Crosslinking* de receptores de complemento (RC), tanto o RC3 como RC1, ou do receptor de Fc de IgG (RFc γ) induz diversos mecanismos que favorecem a sobrevivência da *Leishmania*, como: 1) bloqueio da produção de IL-12, através da inibição da transcrição gênica (SUTTERWALA e cols., 1999); 2) inibição da explosão respiratória em monócitos, impedindo a formação de radicais livres derivados do oxigênio (BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1998); 3) indução da produção do macrófago de grande quantidade de IL-10, que suprime também sua atividade coestimulatória, através da inibição da expressão de B7 (DING e cols., 1993). Tem sido documentado também que a IL-10 induz o bloqueio da secreção de IL-1 e TNF- α (BOGDAN e cols., 1992), levando, dessa forma, à desativação do macrófago e inibição da produção de IFN- γ (KANE & MOSSER, 2000).

A IL-13 é outra citocina que favorece a progressão da doença. Ela apresenta ação sinérgica com IL-4 (MATTHEWS e cols., 2000), mas pode também promover a doença, independentemente da presença de IL-4 (NOBEN-TRAUTH e cols., 1999). Um

microambiente, com predomínio de IL-4, IL-10, IL-13, induz a diferenciação e proliferação de células Th2, levando à desativação dos macrófagos, o que propicia a multiplicação do parasito e a progressão da doença.

Uma vez diferenciados, no linfonodo regional, linfócitos sensibilizados Th1 ou Th2 ou Th1/Th2 migram para o sítio de inoculação da pele, dando início à resposta imune-inflamatória, que, dependendo do tipo de linfócito predominante, poderá destruir o parasito e resolver a infecção ou pode favorecer o crescimento do parasito e a doença ter um curso crônico.

1.3.2.1 A resposta imune na leishmaniose tegumentar humana

Fatores envolvidos no desenvolvimento da doença humana e no controle da infecção são de grande interesse, tanto na elaboração de vacinas, como na terapêutica na leishmaniose.

Na leishmaniose humana observa-se um espectro de resposta imune, com diferentes manifestações clínicas. A infecção assintomática ou oligossintomática representaria um pólo do espectro, onde ocorre controle da infecção, sem desenvolvimento de doença. Pacientes com leishmaniose cutânea localizada podem evoluir para cura espontânea da doença, ou para forma crônica, às vezes com lesões múltiplas e/ou com refratariedade ao tratamento. No outro extremo deste espectro estariam os pacientes com leishmaniose cutânea disseminada que apresentam resposta anérgica, sem controle do crescimento do parasito e doença com curso progressivo.

Como no modelo murino, o desenvolvimento da imunidade mediada por células contra o parasito é fundamental no controle da infecção. Os perfis de citocinas, produzidos por CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar são variados, sugerindo que existe

um espectro de resposta imune. Em um pólo, estariam os indivíduos que controlam a infecção, como os que tiveram cura espontânea (KEMP e cols., 1994, 1999a; CARVALHO e cols. 1995; AJDARY e cols., 2000) ou após tratamento específico (COUTINHO e cols., 1996), assim como alguns pacientes com doença ativa (com lesão localizada), que apresentam resposta tipo Th1. No outro pólo estariam aqueles com LCD na forma polar clássica, que respondem com citocinas tipo Th2 (BOMFIM e cols., 1996; CASTÉS & TAPIA, 1998). No meio deste espectro, estariam os pacientes que apresentam resposta mista Th1/Th2, com predomínio de Th1, passando por um equilíbrio entre estas duas subpopulações, até o franco predomínio de Th2. A resposta mista tem sido observada em pacientes com leishmaniose localizada com longo período de evolução, com lesões múltiplas ou em pacientes com LCM e finalmente nos que apresentam LCD, pós-tratamento (CASTÉS & TAPIA, 1998; GAAFAR e cols., 1995; BOMFIM e cols., 1996).

Outras citocinas importantes no controle ou na patogênese da doença têm sido avaliadas na leishmaniose humana. Na fase inicial da LCL, parte dos pacientes (40%) apresenta linfoproliferação e/ou produção de IFN- γ negativas, após estimulação *in vitro* com antígenos solúveis de *Leishmania*, indicando um quadro de anergia transitória, dado que após seis meses de evolução, estes pacientes apresentam proliferação e produção de IFN- γ comparáveis aos demais que respondem desde o início da doença. Esta imunossupressão parece ser mediada por IL-10 e pode ser revertida pela adição de IL-12 (ROCHA e cols., 1999). Tem sido relatada também uma maior produção de IL-10 em lesões de pacientes com LCM (PIRMEZ e cols., 1990) e em células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LCD (BONFIM e cols, 1996).

A IL-10 é uma citocina com função moduladora da resposta imune, na indução da resposta tipo Th2, como na modulação da resposta tipo Th1 (JOSS e cols., 2000). Na leishmaniose humana, ela encontra-se aumentada em diversas situações, como é no caso da

leishmaniose visceral ativa (BARRAL-NETTO e col., 1998). Na LCL, ela encontra-se aumentada, em parte dos pacientes, no início da infecção (ROCHA e cols., 1999) e em pacientes com doença de longa evolução (BARRAL-NETTO e col., 1998). Além de exercer um papel regulador da resposta imune, ela atua como elemento importante da patogênese da leishmaniose, desativando o macrófago e permitindo a sobrevivência do parasito (BARRAL-NETTO e cols., 1998).

A IL-12 parece ter papel relevante na leishmaniose tegumentar humana. Ela é capaz de reverter a imunossupressão, que ocorre no início da LCL em parte dos pacientes (ROCHA e cols., 1999). Embora ainda seja pouco estudada em pacientes, os dados de sensibilização *in vitro* mostram que ela é uma indutora potente da resposta Th1 e de células CD8⁺ citotóxicas (RUSSO e cols., 1998, 1999; BRODSKYN e cols., 2000).

O TNF- α encontra-se aumentado na LCL e LDC, não sendo detectado na LCD (DA-CRUZ e cols., 1996; CASTÉS & TAPIA, 1998; SILVA, 1999). Ele participa na indução da ativação do macrófago, na formação do granuloma, na lise parasitária e na modulação da intensidade da resposta, antagonizando os efeitos inibitórios da IL-10 e através da indução de NO, de apoptose e de necrose (LIEW & MILLOT, 1990; JOSEPH e col., 1998; BROSSAT e cols., 2000). Nas formas graves da LCL e na LCM, ocorre aumento significativo do TNF- α , chegando a atingir concentrações séricas elevadas (DA-CRUZ e cols., 1996; CASTÉS & TAPIA, 1998; SILVA, 1999), tendo sido sugerido que a sua produção exagerada pode ter papel relevante na lesão tecidual. Além disso, o TNF- α pode induzir o aumento da expressão de ICAM-1 e de HLA-DR nas células endoteliais e nos queratinócitos, o que pode contribuir para aumentar o tráfego e o recrutamento de linfócitos para o sítio de infecção (CASTÉS & TAPIA, 1998). Aparentemente, dependendo da intensidade de sua produção, o TNF- α pode participar do controle da infecção ou contribuir na patogênese das formas graves da doença.

A participação de células T CD8⁺ no controle da infecção tem sido avaliada. A caracterização fenotípica das células T Ag-específicas, do sangue periférico, mostra particularidades e muita variedade nas diferentes formas clínicas da doença. Na LCM e LCD tem sido descrito um aumento variável de linfócitos T CD8⁺ (CASTÉS e cols., 1998). Com relação a LCL, vários autores observaram frequência baixa de células T CD8⁺ (DARCRUZ e cols., 1994; COUTINHO e cols., 1996; CASTÉS e cols., 1998; MAASHO e cols., 1998), enquanto que, MODLIN e cols. (1985) e ISAZA e cols. (1996) mostraram que na LCL por *L. venezuelensis* e *L. panamensis* ocorre um predomínio de T CD8⁺.

Nestes trabalhos os autores não analisaram a resposta em relação ao tempo, é possível que fatores relacionados ao tempo de evolução, ou mesmo inerentes à espécie do parasito ou a fatores genéticos do hospedeiro possam determinar esta diferença. Em lesões de LCL, que foram analisadas levando em conta o tempo de evolução, parece haver uma dinâmica no fluxo de migração dos linfócitos T CD8⁺ para a lesão. No trabalho de SILVA (1999), foi observado que na LCL, as células T correspondem a 50% do infiltrado celular, com predomínio de T CD4⁺. No entanto, nas lesões que apresentavam necrose em granulomas ou nas de pacientes com mais tempo de evolução (com mais de 10 semanas), a frequência de células T CD8⁺ era maior. Em pacientes com LCM, o infiltrado de linfócitos T correspondeu a 60%, com proporções semelhantes de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Na LCD foi visto elevação da frequência relativa de linfócitos T CD8⁺. Porém, foi verificada uma importante diferença em relação às duas formas mencionadas acima. Nas lesões de LCD, as células T correspondem a somente 10% do infiltrado. Como não ocorre secreção de IFN- γ , nem nas lesões (SILVA, 1999), nem em CMSP estimuladas in vitro com Ag. de *Leishmania* (BOMFIM e cols., 1996), é possível que estas células T CD8⁺ sejam do tipo Tc2, participando do quadro de imunossupressão da LCD, como descrito na hanseníase virchowiana (JANEWAY e cols., 1999).

Células T CD8⁺ ativadas são capazes de induzir citólise de células infectadas, através da exocitose de grânulos de perforina, ou pela estimulação de FasL, que pode levar à apoptose. Linfócitos T CD8⁺ têm, também, a capacidade de secretar citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL4, IL-10, TGF- β) e quimiocinas (MIP-1 α) (HARTY e cols., 2000). Assim, células T CD8⁺ podem desempenhar tanto um papel protetor, produzindo IFN- γ , como modulador ou mesmo exacerbador da doença, produzindo IL-10 ou TGF- β , dependendo do tipo funcional que está sendo ativado.

A participação de células T CD8⁺ na resposta protetora tem sido sugerida, tanto no modelo murino (MULLER e cols., 1994) como na infecção humana (DA-CRUZ e cols., 1994; COUTINHO e cols., 1996; MAASHO e cols., 1998). Pacientes de LCL curados apresentam uma mudança do fenótipo, ocorrendo predomínio de linfócito T CD8⁺, tanto em infecções por *L. braziliensis* (DA-CRUZ e cols., 1994; COUTINHO e cols., 1996), como por *L. aethiopica* (MAASHO e cols., 1998). Porém, esta resposta parece ter particularidades, possivelmente espécie-específicas, porque pacientes curados, de infecção por *L. major*, mostram um predomínio de linfócitos T CD4⁺ (AJDARY e cols., 2000).

A atividade citotóxica tem sido demonstrada nas lesões de pacientes com LCL, com menos de 6 meses de evolução (CONCEIÇÃO-SILVA e cols., 1998) e em CMSP de pacientes com LCM (BRODSKYN e cols., 1997), sugerindo que a atividade citotóxica pode estar associada tanto ao mecanismo protetor, lisando macrófagos parasitados, como à patogênese da doença na LCM, acarretando dano tecidual.

1.4 VACINAÇÃO NA LEISHMANIOSE

Os programas correntes de controle das leishmanioses estão baseados na eliminação do reservatório infectado, na redução do vetor e no tratamento precoce dos

indivíduos com leishmaniose. Vários fatores contribuem para a limitação destas abordagens. Primeiro, a eliminação do reservatório infectado e a eliminação do vetor estão restritas à transmissão peridomiciliar. Uma outra dificuldade enfrentada é a diversidade de padrões epidemiológicos observados, os quais variam de acordo com a espécie de *Leishmania* (GRIMALDI & TESH, 1993). Em conjunto, estes dados justificam a falta de sucesso verificada no programa de controle vigente. Assim, a prevenção da doença através da imunização passa a ser a medida mais viável para o controle da doença, embora seja também uma meta difícil.

A resolução da infecção natural, com ou sem tratamento, induz a proteção contra re-infecção (THOMSON, 1931; PESSOA & BARRETO, 1944), o que respalda a viabilidade de imunização através de vacinação. Tentativas de imunização já eram realizadas como prática empírica pelos judeus de Bagdá, que inoculavam as crianças com material obtido de úlceras leishmanióticas, para evitar que elas adquirissem a doença. Os primeiros trabalhos sistemáticos de vacinação contra leishmaniose foram descritos no início do século XX (MARZINOWSKI, 1928).

Diversas abordagens têm sido utilizadas na tentativa de encontrar uma vacina contra leishmaniose. Embora sejam inúmeras as tentativas, ainda não se dispõe de uma vacina eficaz (ENGERS e cols., 1996; ABATH, 2000). Tem sido registrada vacinação com promastigotas vivas (SALAZAR J, 1965; KOUFMAN e cols., 1978; MUKHOPADHYAY e cols., 1999) ou mortas (PESSOA & PESTANA, 1940; PESSOA 1941; MAYRINK e cols., 1985; ARMIJOS e cols., 1998; MARZOCHI e cols., 1998), com parasito avirulento pela remoção de gene específico (TITUS e cols., 1995; VERAS e cols., 1999), com frações do parasito (BARRAL-NETTO e cols., 1987; MONJOUR e cols., 1992), com moléculas recombinantes (SJOLANDER e cols., 1998; SKEIKY e cols., 1998; AEBISCHER e cols., 2000; KREMER e cols., 2001) ou bactéria carreando e expressando genes de *Leishmania*

(HANDMAN e col., 1995; MOUGNEAU e cols., 1995; GONZALEZ e cols., 1998; MELBY e cols., 2000).

Os ensaios clínicos realizados no Novo Mundo têm priorizado o uso de promastigotas mortas, por conta da maior virulência das cepas desta região (SALLES, 1939; PESSOA & PESTANA, 1940; PESSOA, 1941a, b; MAYRINK e cols., 1979, 1985 e 1986; ANTUNES e cols., 1986; NASCIMENTO e cols., 1990; ARMIJOS e cols., 1998; MARZOCHI e cols., 1998). Estes estudos têm mostrado que a vacinação leva a uma redução parcial da incidência da doença (SALLES, 1939; PESSOA e cols., 1940; ANTUNES e cols., 1986; ARMIJOS e cols., 1998; GENARO e cols., 1996), induz a proliferação de células T, com predomínio de T CD8⁺ e a produção de IFN γ pelas CMSP de indivíduos vacinados, em resposta à estimulação com antígenos de *Leishmania* (NASCIMENTO e cols., 1990; MENDONÇA e cols., 1995).

Apesar dos resultados serem promissores, ainda não existe uma vacina eficaz. Uma etapa importante para o desenvolvimento de uma nova vacina é a identificação do tipo de resposta imunológica que possa levar à eliminação do parasito, com o mínimo de destruição do tecido sadio.

1.5 SENSIBILIZAÇÃO IN VITRO

Pouco se conhece sobre a resposta inicial na leishmaniose humana. Não é possível estudar a fase inicial da infecção humana, tanto devido às restrições éticas como à dificuldade de precisar o momento da inoculação da *Leishmania*. Uma alternativa seria o estudo da sensibilização na resposta à vacina. Esta alternativa, embora interessante, apresenta a desvantagem das vacinas disponíveis contra leishmaniose serem constituídas por promastigotas mortas ou formas vivas avirulentas, o que pode levar à resposta diferente daquela induzida por promastigota viável e virulenta, como ocorre na infecção natural.

Uma outra alternativa que pode ser utilizada para estudo da resposta imune inicial pode ser a de sensibilização *in vitro*.

SHANKAR e cols. (1993, 1997) avaliaram a resposta primária de células esplênicas murinas *in vitro*. Populações de esplenócitos foram sensibilizadas com *Leishmania major* e re-estimulados com células apresentadoras autólogas, demonstrando que células T específicas para *Leishmania* podem ser geradas de populações não sensibilizadas, *in vitro*. SOARES e cols. (1997), utilizando o mesmo sistema, concluíram que a sensibilização *in vitro* reproduzia a resposta da infecção *in vivo*. Utilizando um sistema *in vitro* de sensibilização de esplenócito murinos com *L. amazonensis*, GOMES e cols. (2000) evidenciaram que IL-10 é importante no crescimento da carga parasitária em linhagem susceptível

RUSSO e cols. (1998, 1999) sensibilizaram CMSP humanas com macrófagos autólogos infectados com *Leishmania* e avaliaram linhagens de células T de longa duração. Observaram que a maioria das linhagens de células T humanas, específicas para *Leishmania*, produz citocinas tipo Th1 ou Th0 e que a sensibilização, na presença de IL-12 exógena, gera potente resposta Th1 e células T CD8⁺ citotóxicas. BRODSKYN e cols. (2000), utilizando um sistema de sensibilização de curta duração, confirmaram o papel de IL-12 na geração de resposta Th1 e verificaram que CD86 e CD40 têm papel importante na ativação de células T durante a sensibilização com *L. major* (BRODSKYN e cols., 2001).

A sensibilização *in vitro* parece ser um método alternativo importante para o estudo das interações iniciais na infecção humana por *Leishmania*. No entanto, ainda não foi demonstrado se ela reproduz a resposta imune observada na sensibilização humana *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a resposta imune inicial humana à antígenos de *Leishmania*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os eventos iniciais da resposta imune de seres humanos à antígenos de *Leishmania*, tanto in vitro como in vivo;
2. Padronizar um sistema de sensibilização in vitro (SSIV) de CMSP com *Leishmania*;
3. Avaliar a capacidade do SSIV prever as alterações observadas após a imunização in vivo.
4. Especificar as subpopulações celulares e o perfil de citocinas gerados na resposta imune inicial, após sensibilização in vitro ou após vacinação com *L. amazonensis*;
5. Avaliar a ativação linfocitária nestes dois sistemas, in vitro e in vivo;
6. Analisar as citocinas envolvidas na modulação da resposta imune inicial, nestes dois sistemas, in vitro e in vivo;

3 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose, segundo a Organização Mundial de Saúde, está entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no mundo. Apesar das medidas adotadas nos programas de controle, nos últimos 10 anos, a doença vem se tornando endêmica e aumentando sua incidência em diversas regiões do mundo (WHO, www.who.int/emc/diseases/leish/leisdis1.html, 2000). Para planejar estratégias eficazes para o controle da leishmaniose, é necessário conhecer amplamente a cadeia de transmissão e a patogênese da doença. Apesar dos avanços nos conhecimentos nessas áreas, ainda existem lacunas importantes que impossibilitam a adoção de medidas eficazes para o seu controle.

Muito se avançou na compreensão da patogênese da leishmaniose no modelo murino e na doença humana. Os primeiros momentos da interação da *Leishmania* com células do sistema imune do hospedeiro levam à produção de citocinas implicadas na determinação da resposta imune e no controle ou progressão da doença. A manipulação do micro-ambiente nos momentos iniciais da infecção pode modificar o curso da doença, tornando linhagens de camundongos susceptíveis em resistentes, e vice-versa (BOGDAN e cols., 1993; SCOTT, 1998).

Os perfis de citocinas, produzidos por CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar são variados, sugerindo que existe um espectro de resposta imune. Conhecer as fases iniciais da apresentação de antígeno da *Leishmania* na infecção humana pode trazer achados importantes para elucidação do vasto espectro de resposta imune observada na leishmaniose humana.

Como não é possível estudar os eventos iniciais da leishmaniose humana, devido a restrições éticas, sistemas *in vitro*, que reproduzam os momentos iniciais da infecção

humana, podem contribuir para compreender a patogênese da doença humana e orientar estratégias para construção de vacinas. Além disso, a triagem de antígenos imunogênicos, no sistema *in vitro*, apresenta vantagens na segurança dos voluntários, nos custos e na comparação de mais de um antígeno na mesma população.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 VOLUNTÁRIOS SADIOS

Para a padronização do sistema *in vitro*, para os ensaios de bloqueio de citocina e os de citocina intracelular, foram utilizados *buffy coat* do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará (HEMOCE) ou do Centro de Hemoterapia e Hematologia da Bahia (HEMOBA). Para a avaliação da resposta imune inicial, *in vitro* e após vacinação foram selecionados 32 voluntários sadios, entre 18 e 40 anos de idade, do 10º Grupo de Artilharia de Campo e alunos da Escola Formadora de Sargentos do 23º Batalhão de Caçadores, da cidade de Fortaleza, Ceará. Todos os voluntários incluídos neste estudo foram procedentes de áreas sem transmissão de leishmaniose e sem história prévia de infecção por *Leishmania*. Apresentavam exame clínico normal, IDRM e linfoproliferação negativas para antígenos de *Leishmania*, além de sorologias negativas para leishmaniose, doença de Chagas e HIV. Todos os voluntários foram esclarecidos sobre a finalidade do estudo e os riscos inerentes ao procedimento, e todos concordaram em participar do trabalho e assinaram o termo de compromisso (Anexo 1).

4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os indivíduos que apresentaram IDRM e/ou sorologia e/ou resposta linfoproliferativa positivas para antígenos de *Leishmania*. No caso de *buffy coat*, o critério utilizado para exclusão foi somente a resposta linfoproliferativa positiva.

4.3 PARASITO E ANTÍGENO

Foi utilizada a *L. amazonensis*, cepa BA 125, caracterizada por iso-enzimas e anticorpos monoclonais (ALMEIDA e cols., 1996). Para a estimulação *in vitro* das CMSP foram utilizadas promastigotas vivas, em fase estacionária de crescimento, cultivadas em meio Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), suplementado com 5 % de soro bovino fetal (SBF) (Gibco BRL), 2 % de urina estéril e 50 µg/ml de gentamicina (Gibco BRL). As promastigotas foram lavadas três vezes com salina e re-suspensas em RPMI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) na concentração indicada. No caso de estimulação com promastigotas mortas, a suspensão celular foi submetida a 56°C por 30 min. Após o tratamento térmico, metade da suspensão de promastigotas foi sonicada e misturada com a metade íntegra (MAYRINK e cols., 1979).

4.4 INTRADERMO-REAÇÃO DE MONTENEGRO

A IDRМ para triagem dos voluntários foi realizada logo após a primeira coleta de sangue, com injeção intradérmica de 0,1 ml de antígeno solúvel de *L. amazonensis*, (MHOM-BR-86BA-125) contendo 25 µg de proteína por mililitro, preservado em fenol (REED e cols., 1986), produzido no Serviço de Imunologia do Hospital Edgar Santos - UFBA. A IDRМ, para avaliação da resposta imune à vacina, foi realizada no 40º dia pós-vacinação, após a coleta de sangue. Foi considerada como positiva a reação com diâmetro igual ou superior a 5 mm.

4.5 DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*LEISHMANIA*

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* foi realizada através de ELISA, com diluições seriadas (EVANS e cols., 1992). A placa foi sensibilizada com 100 µL do antígeno, na concentração de 2×10^7 promastigotas/ml, por um pernoite a 4°C. Após a sensibilização, os poços foram lavados com salina tamponada com fosfato (STF) contendo 0,05% de Tween 20 e bloqueados com STF contendo 1,5% de SBF. Após o bloqueio, as amostras de soros foram diluídas 1:80, adicionadas na placa e incubadas por 1 hora a 37°C. Depois de 4 lavagens, a placa foi incubada com proteína A conjugada à peroxidase (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). A reação foi revelada com 2,2 azinodio-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid (ABTS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) e feita a leitura a 405 nm, em ELISA Multiskan Reader. Controles positivos e negativos foram incluídos em todos os ensaios. Foram definidos como positivos aqueles com absorvância $\geq 0,1$, considerado como ponto de corte, determinado previamente em ensaios com soros negativos e positivos para *Leishmania*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi*. Todas as amostras positivas foram repetidas com diluições seriadas (1:80, 1:160 e 1:320).

4.6 DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA

A estimulação foi feita com sangue total, diluído 1:10, cultivado em triplicatas e estimulado com promastigotas vivas, a 2×10^6 /ml, ou concanavalina A (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) na concentração de 10 µg/ml, ou sem estímulo, em placa de 96 poços com fundo em U. As células foram cultivadas por 5 dias e incubadas com timidina- H^3 por 16 h. O índice de proliferação foi calculado, dividindo a cintilação por minuto (CPM) da cultura estimulada com antígeno pela CPM da cultura não estimulada. Foi considerada como

resposta linfoproliferativa positiva a que tivesse índice de estimulação igual ou superior a 5, limite considerado como ponto de corte, em ensaios prévios realizados no laboratório, levando em conta a média ± 3 desvios padrões do índice de estimulação de indivíduos não expostos à *Leishmania*.

4.7 SISTEMA DE SENSIBILIZAÇÃO *IN VITRO* (SSIV) DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO COM *L. AMAZONENSIS*

A sensibilização dos linfócitos foi feita, segundo o esquema na Fig. 1. CMSP, separadas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), foram lavadas três vezes e ressuspensas em RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com 2 mM de glutamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 10mM de HEPES (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 50 μ g/ml de gentamicina e 10% de soro AB humano inativado pelo calor. Parte das CMSP foi cultivada em RPMI suplementado, com antígeno ou só com meio. Da outra parte, foram isoladas as células não aderentes e destinadas para a re-estimulação, como descrito a seguir:

- **Primeira estimulação:** 5×10^6 CMSP viáveis/ml foram distribuídas em placas de 24 poços, 1 ml/poço, e cultivadas com ou sem promastigotas, a 37°C e 5% CO₂, em atmosfera úmida, por 6 dias.
- **Células apresentadoras de antígeno:** Parte das CMSP, na concentração de 5×10^6 /ml, foram ressuspensas em meio sem soro, distribuídas em placas de 24 poços, 1 ml/poço, e cultivadas por 30 minutos a 37°C e 5% CO₂, em atmosfera úmida. As células não aderentes foram retiradas através de lavagens com salina morna e as aderentes foram cultivadas em RPMI

suplementado, a 37°C e 5% CO₂, em atmosfera úmida, até o momento da infecção. No 5º dia de cultivo, os macrófagos foram infectados com promastigotas vivas de *L. amazonensis* na proporção parasito: macrófago, de 10:1 e mantidos em cultura a 37°C e 5% CO₂, por 24 h.

- **Segunda estimulação:** No 6º dia, os linfócitos da primeira estimulação foram coletados em meio RPMI, centrifugados, ressuspensos em meio suplementado, na concentração de 10⁶/ml, sendo então adicionados aos poços contendo macrófagos autólogos infectados, juntamente com 10% de meio recondicionado da primeira estimulação. A cultura foi mantida a 37°C e 5% CO₂, por 4 dias.

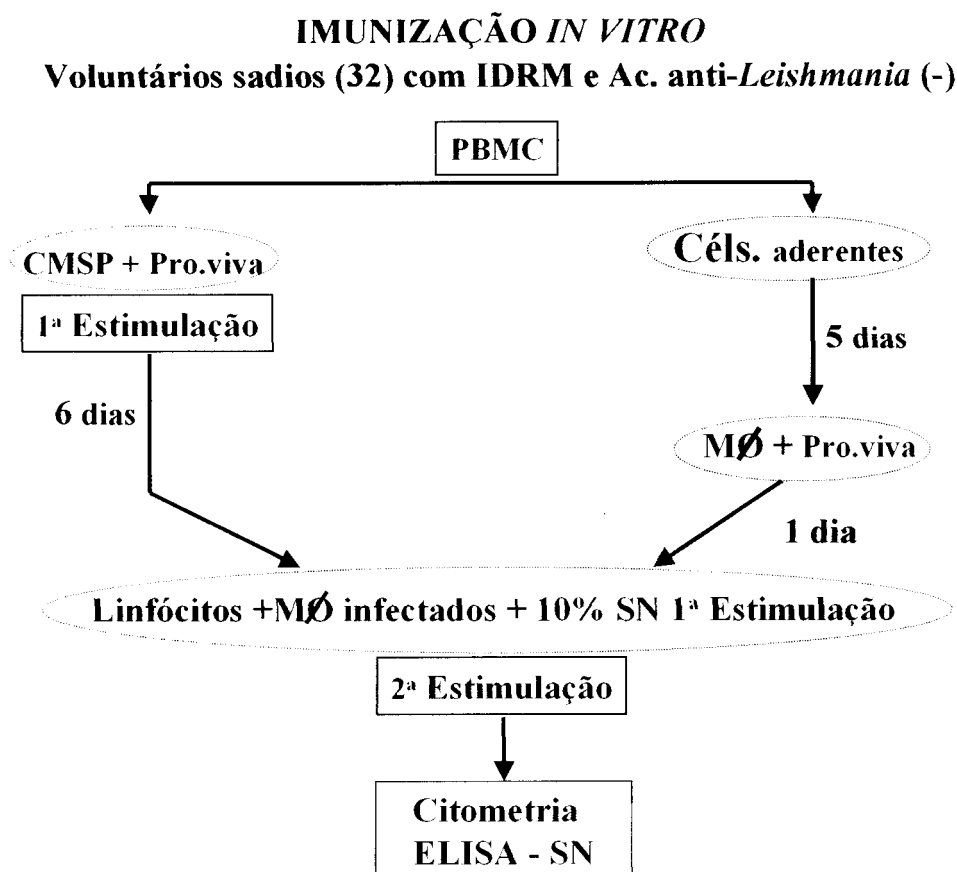


Figura 1 - Protocolo adotado para sensibilização in vitro de CMSP de indivíduos sadios, com promastigotas vivas de *L. amazonensis*. IDR= intradermo-reação de Montenegro; CMSP= células mononucleadas do sangue periférico; SN= sobrenadante; MO= macrófago.

4.8 ANTICORPOS

Anti-CD3 – fico-eritrina (PE) (clone SK7), anti-CD4 – isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou PE (clone SK3), anti-CD8 – Cy (clone SK1), anti-CD19 – FITC (clone 4G7), anti-CD56 – PE (clone MY31), anti-CD25 – FITC (clone 2A3), anti-CD71 – FITC (clone LO1.1) e anticorpos isotipos marcados pareados foram obtidos da B&D (CA, EUA). Para citocina intracelular foi usado anti-IFN- γ - FITC (MHCIFN01), anti-IL-10 – PE (RHCIL1004) e os isotipos marcados pareados, todos obtidos da Caltag (CA, EUA). Para os ensaios de bloqueio foram utilizados os anticorpos: anti-IL10 humana (MAB 217, clone 2373811, R&D), anti-IL-4 (MAB 204, clone 34019111, R&D), anti-TGF β_1 (MAB240 clone 9016.2, R&D).

4.9 MARCAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS E DE ATIVAÇÃO CELULAR

No quarto dia de cultivo da segunda estimulação, as células não aderentes foram colhidas, lavadas em salina tamponada com fosfato, contendo albumina bovina 1% e azida 0,1% (tampão FACS) gelado e incubadas com os seguintes marcadores de subpopulações (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD56) e de ativação: anti-receptor de IL-2 (CD25) e anti-receptor de transferrina (CD71), a 4°C por 30 minutos, protegidas da luz. As células foram adquiridas em citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) e analisadas com o software Cell Quest, com 10.000 eventos/amostra. As frequências das subpopulações linfocitárias foram analisadas na janela de linfócitos, SSC *versus* FSC. Os limites dos quadrantes foram determinados com as células marcadas com

os isotipos. Para a análise das citocinas intracelulares, a janela foi delineada na região de marcação, CD4⁺ ou CD8⁺ *versus* SSC. As delimitações dos quadrantes foram estabelecidas com as células cultivadas só com meio e marcadas com os anticorpos anti-citocinas.

4.10 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS DO SOBRENADANTE DAS CULTURAS

Após a sensibilização das CMSP com *Leishmania*, sobrenadantes das culturas, livres de células, foram coletados com 72 h de cultivo, em ambas estimulações, aliqüotados e mantidos a -20°C. A quantificação de citocinas foi feita através de ensaios de ELISA comercializados, segundo instruções do fabricante: IFN- γ , TNF- α , IL-5 e IL-12 total (Duo-Set, Genzime, MA); IL-10 (Genzime, MA).

Como as concentrações de células utilizadas no primeiro e segundo ciclos de estimulações foram diferentes, (5×10^6 /ml e 10^6 /ml, respectivamente) os resultados das concentrações de citocinas foram normatizados para pg/ 10^6 cels

4.11 MARCAÇÃO DE CITOCINAS INTRACELULARES NO SSIV

Utilizamos o protocolo estabelecido por OPENSHAW (1995), modificado. As células, da segunda estimulação, com 48h de cultivo, foram colhidas e marcadas as moléculas de superfície (CD3, CD4, CD8, CD25 e CD71). Após a incubação, foram lavadas com tampão FACS e fixadas com Cytotfix® (Pharmingen) por 30 min. Depois de fixadas, foram lavadas com tampão FACS e feitos a permeabilização e o bloqueio em Permwash® (Pharmingen) com 20% de SBF, por 30 min., a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado anti-IFN- γ - FITC, anti-IL-10 – PE ou os isotipos controles FITC ou

PE, e a placa foi incubada por um período adicional de 30 min., à temperatura ambiente, protegida da luz. As células foram, então, lavadas duas vezes com Permwash® e ressuspensas em tampão FACS, para análise por citometria de fluxo. Foi considerado, como aumento de células expressando IFN- γ ou IL-10, a diferença entre o percentual das células-teste e o percentual das células cultivadas com meio, também marcadas com anti-IFN- γ -FITC ou IL-10-PE.

4.12 BLOQUEIO DE CITOCINAS NO SSIV

Nos ensaios de bloqueio foram adicionados separadamente no início de ambas estimulações: anti-IL-4, nas concentrações de 1 μ g/ml ou 10 μ g/ml; anti-IL-10 (1 ou 10 μ g/ml); anti-TGF β (1 μ g/ml) ou anticorpos isotipos (10 μ g/ml).

4.13 VACINAÇÃO CONTRA LEISHMANIOSE

A vacina usada continha uma cepa de referência da Organização Mundial de Saúde (OMS), *L. amazonensis* (IFLA / BR / 67 / PH8). Foi produzida, segundo as prescrições de manuseio da OMS, pela BIOBRAS - uma empresa de biotecnologia licenciada pelo Ministério da Saúde. A vacinação consistiu de duas doses de 1,4 mg de nitrogênio protéico/dose, em 1,5 ml, intramusculares, com intervalo de 21 dias (MARZOCHI e cols. 1998).

4.14. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PRÉ E PÓS-VACINAÇÃO

As avaliações pré e pós-vacinação, com 40 dias e 6 meses, foram feitas através da quantificação de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-5 e IL-10) nos sobrenadantes de culturas de CMSP, estimuladas *in vitro* com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, por 4 dias. Foi avaliada também a expressão de marcadores de subpopulações (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD56) e de ativação celular (anti-CD25 e anti-CD71), de células *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, por 4 dias.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações de resposta do mesmo indivíduo foram realizadas pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas, para as análises entre respondedores rápidos e lentos, o de Mann-Whitney. Todas análises estatísticas foram realizadas, utilizando o programa GraphPad Prism, versão 3.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA.

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DO SSIV DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO COM *L. AMAZONENSIS*

Para otimizar o sistema de sensibilização *in vitro*, foram testados o tipo e a concentração de antígeno com melhor capacidade imunogênica. Além disso, foram avaliadas, também, a cinética do crescimento celular e a concentração ótima de células para o segundo ciclo de estimulação.

Para determinar as melhores condições deste sistema de sensibilização *in vitro* foi adotado como critério de otimização, aquele capaz de induzir a mais alta concentração de IFN- γ .

5.1.1 Avaliação da resposta a diferentes tipos de antígeno de *Leishmania*

Em todas as concentrações de células utilizadas, a resposta linfoproliferativa de CMSP, de indivíduos com LTA curados (n=6), foi maior quando as células foram estimuladas com promastigotas vivas do que com mortas pelo calor. A concentração que induziu melhor resposta foi a de 5×10^6 promastigotas/ml, (p=0,03), (Fig. 2A).

Testando a produção de IFN- γ no sobrenadante de culturas de indivíduos não expostos (n=14), nos dois ciclos de sensibilização, promastigotas vivas induziram também maior produção de IFN- γ que mortas, chegando a estimular cerca de duas vezes mais em ambas estimulações, (mediana da 1ª estimulação= 292 pg/10⁶ cels. *versus* 139 pg/10⁶ cels., (p=0,005); (mediana da 2ª estimulação = 694,5 pg/10⁶ cels. *versus* 389,4 pg/10⁶ cels., (p=0,006) (Fig. 2B).

5.1.2 Determinação da melhor concentração do antígeno e cinética do crescimento celular

Células de indivíduos sadios foram estimuladas com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, em diferentes concentrações. No primeiro ciclo de estimulação (em todas as concentrações de células utilizadas), observou-se um declínio do número de células até o quinto dia de cultivo, comparável ao das não estimuladas ($p < 0,05$ em todas as concentrações avaliadas), (Fig. 2C). No segundo ciclo, verificou-se que, a partir do quinto dia de cultivo, as células não estimuladas apresentavam redução de seu número, para aproximadamente a metade de sua concentração original, enquanto que as que foram estimuladas com *Leishmania* apresentavam crescimento celular importante, sendo este fato mais evidente na concentração de 10^6 promastigotas/ml ($p = 0,02$), (Fig. 2D). Estes dados foram consistentes, repetindo-se em três ensaios.

5.1.3 Avaliação da melhor concentração celular e do número de ciclos de estimulação

Para a cultura do segundo e do terceiro ciclos de estimulação, foram testadas três concentrações de células derivadas do primeiro ciclo de sensibilização: 1×10^6 , 2×10^6 e 3×10^6 cels./ml. A melhor resposta foi observada com a concentração de 1×10^6 cels./ml, induzindo produção de IFN- γ cerca de duas vezes mais que as demais condições testadas ($p = 0,03$) (Fig. 3). O terceiro ciclo de estimulação apresentou um comportamento muito heterogêneo, se por um lado, em alguns sobrenadantes a concentração de IFN- γ encontrava-se aumentada em até 5 vezes, em relação à segunda estimulação, por outro lado, 55% das culturas apresentaram menor produção de IFN- γ que a observada no

segundo ciclo. Por este motivo, o terceiro ciclo de estimulação não foi adotado no protocolo.

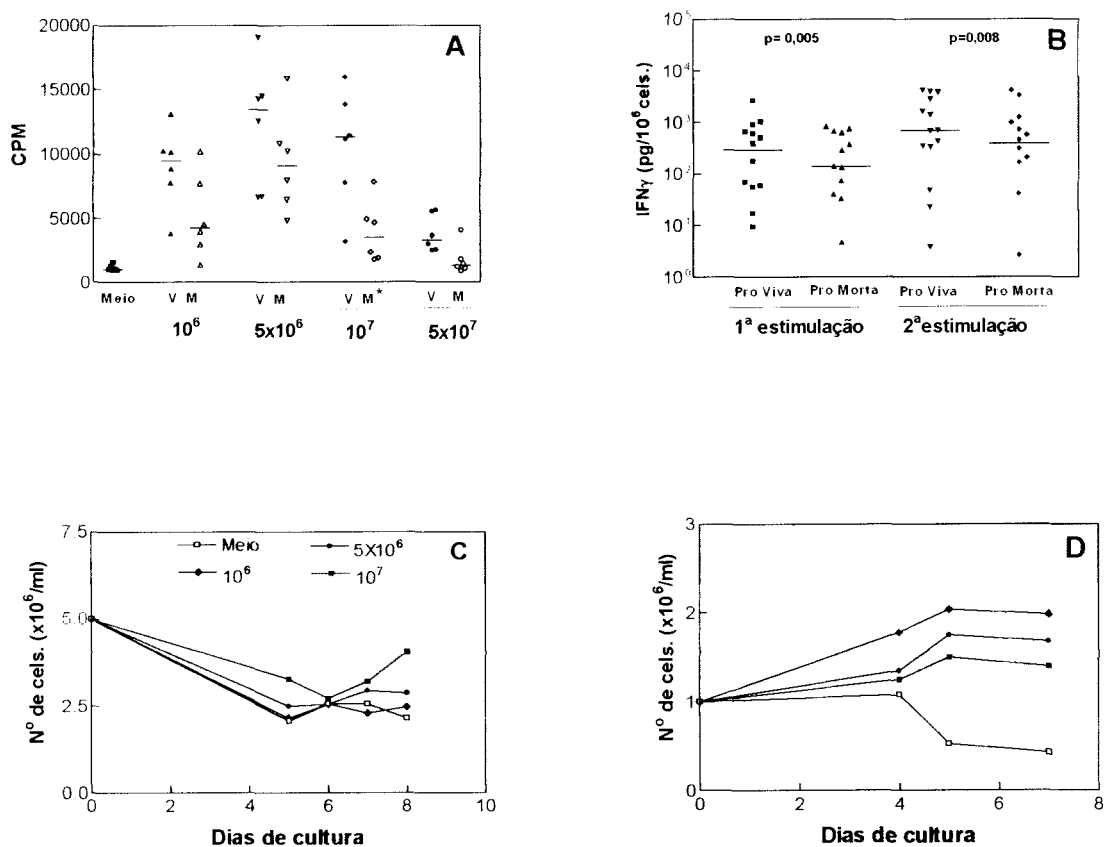


Figura 2 – Padronização da concentração e tipo de antígeno para a sensibilização in vitro. **A.** Comparação da resposta linfoproliferativa de CMSP, de pacientes com LTA curados, estimuladas com diferentes concentrações de promastigotas, vivas (V) ou mortas pelo calor (M); **B.** Produção de IFN γ nos sobrenadantes de culturas de CMSP, de indivíduos saudáveis, estimuladas com promastigotas vivas ou mortas pelo calor, nos dois ciclos de estimulação; Cinética do crescimento celular de CMSP, de indivíduos saudáveis, estimuladas com diferentes concentrações de promastigotas vivas, no primeiro (**C**) e segundo (**D**) ciclos, respectivamente.

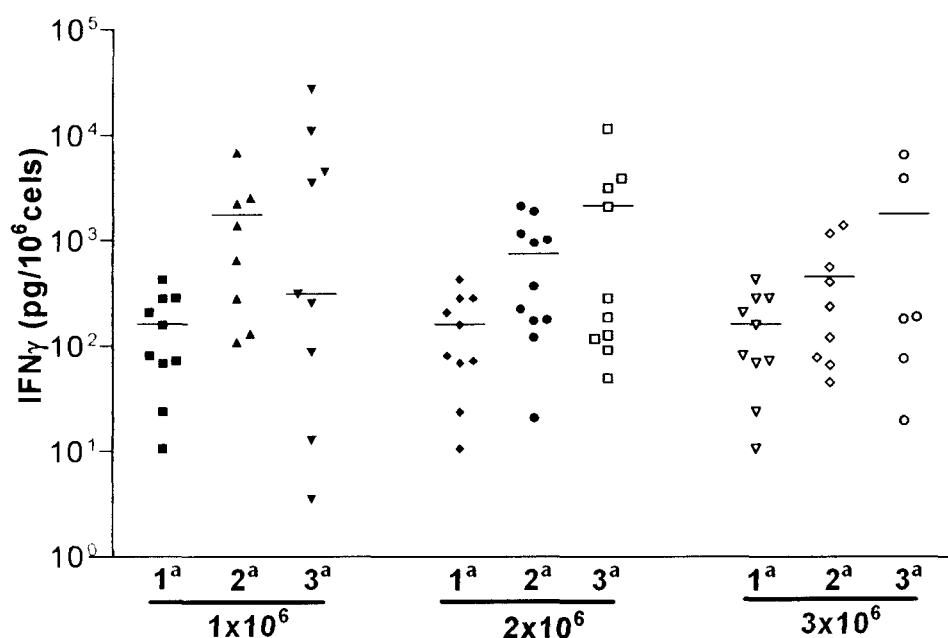


Figura 3 - Produção de IFN γ (MD) nos sobrenadantes de culturas de CMSP, de indivíduos saudáveis, cultivadas com promastigotas de *L. amazonensis* em três ciclos de estimulação (indicados como 1^a, 2^a e 3^a), com três concentrações diferentes de células - 1x10⁶, 2x10⁶ e 3x10⁶ cels./ml.

5.2 RESPOSTA IMUNE A *L. ANAZONENSIS* NO SSIV

O primeiro ciclo de estimulação foi realizado com a concentração de 5x10⁶ promastigotas vivas/ml, e o segundo com 10⁶ promastigotas/ml. No quinto dia de cultivo, os macrófagos (da placa de células aderentes) foram infectados com 10⁶ promastigotas/ml e permaneceram em cultivo por mais 24 h. No sexto dia, os blastos gerados na primeira estimulação foram colhidos, ajustados para 10⁶ cels/ml, e re-estimulados com os macrófagos autólogos infectados. Foi adicionado à cultura, 10% de meio condicionado na primeira estimulação, e cultivada por mais quatro dias (Fig. 1).

5.2.1 Avaliação da produção de IFN γ

No início da sensibilização, com apenas 72h de estimulação com promatigotas, já era possível observar, em parte dos voluntários, secreção de IFN γ em quantidades significativas nos sobrenadantes das culturas. Após a sensibilização, no final do segundo ciclo de estimulação, verificou-se um aumento na secreção desta citocina, na magnitude de três vezes, em relação ao início ($p=0,005$) (Fig. 4 A).

Embora todos os voluntários não tivessem história de contato prévio com *Leishmania*, parte deles apresentou, com três dias de cultivo, produção significativa de IFN- γ nos sobrenadantes, enquanto os demais produziram pequena quantidade ou não o fizeram. Este comportamento tornou-se mais evidente no segundo ciclo de estimulação (Fig. 4A). Verificou-se, portanto, dois padrões distintos de resposta: indivíduos que apresentavam secreção rápida e alta de IFN- γ , e indivíduos sem produção significativa desta citocina, quando suas CMSP eram sensibilizadas com *Leishmania*. Desta forma, eles foram divididos em dois grupos: alto ($n=16$) ou baixo respondedores ($n=16$), usando como ponto de corte a mediana da quantidade de IFN- γ secretada no sobrenadante de todos os voluntários, no segundo ciclo da sensibilização, admitindo-se que neste momento já houvesse ocorrido expansão significativa de linfócitos específicos para *Leishmania*.

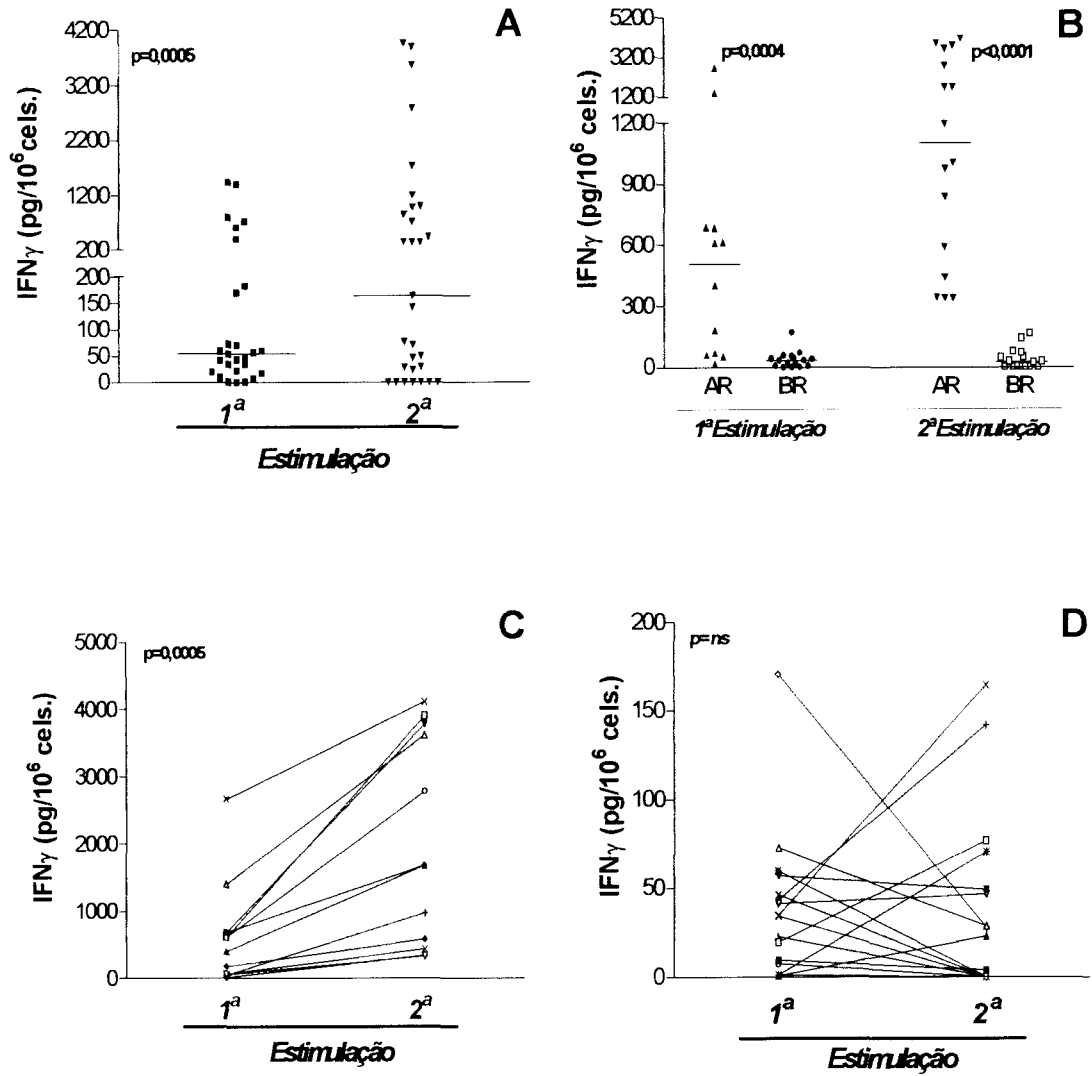


Figura 4 - Mediana da concentração de IFN γ produzido por CMSP sensibilizadas in vitro com *L. amazonensis*. **A**. Concentração de IFN- γ , no primeiro e no segundo ciclos da sensibilização; **B**. Produção de IFN γ pelos AR ou BR; **C**. Comportamento da secreção de IFN- γ , nos sobrenadantes de AR; **D**. Comportamento da secreção de IFN- γ , nos BR. ($p=ns$ - não significativo)

A produção de IFN- γ nos sobrenadantes dos AR aumentou aproximadamente 2 vezes, no segundo ciclo da sensibilização (média= 620,3 e 1724 pg/10⁶cels., no início e no final da sensibilização, respectivamente) (Fig. 4B). Os BR continuaram com concentrações de IFN- γ comparáveis às observadas no início da sensibilização (média= 38,9 e 39,5 pg/10⁶cels.). A diferença entre os dois grupos foi, também, evidenciada pela tendência dos AR a aumentarem a secreção de IFN- γ no final da sensibilização (Fig. 4C), enquanto nos BR não se observou tal tendência (Fig. 4D e 5A).

5.2.2 Avaliação da produção de outras citocinas

Foram também avaliadas as concentrações de TNF- α , IL-10 e IL-5 nos sobrenadantes de culturas das CMSP estimuladas com promastigotas, no início e no final da sensibilização. TNF- α e IL-10 são citocinas importantes na leishmaniose humana e murina, e IL-5 foi usada como um marcador da resposta Th2, dada à dificuldade de quantificar IL-4 em seres humanos.

A produção de TNF- α apresentou correlação positiva com a de IFN- γ , em ambos os grupos. Os AR apresentaram 123,2 pg/10⁶ cells., no primeiro ciclo da sensibilização, aumentando para 181,1 pg/10⁶ cells. no segundo. Nos BR, esta citocina foi encontrada em baixa quantidade, nos dois ciclos de sensibilização (24 pg/10⁶ cells. e 11,1 pg/10⁶ cells.). A diferença entre os dois grupos foi significativa nos dois pontos avaliados (Fig. 5B).

Nos AR, observou-se, no início, concentração elevada de IL-10 (média = 91,6 pg/10⁶ cells.), tendo permanecido alta após a sensibilização (média = 79,8 pg/10⁶ cells.). Os BR produziram-na, inicialmente, em baixas concentrações (média= 27,6 pg/10⁶ cells.) e aumentaram sua produção após a sensibilização (média= 47,3 pg/10⁶ cells.). (Fig. 5C). A diferença entre os dois grupos foi significativa somente no primeiro ciclo da sensibilização.

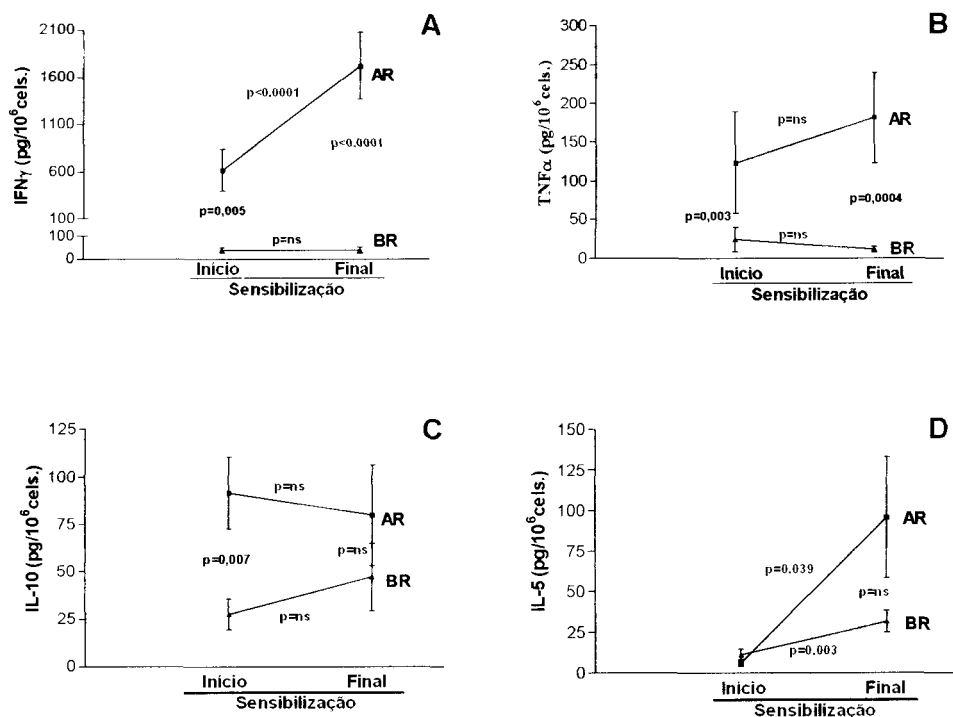


Figura 5 - Perfil de citocinas produzidas (média \pm erro padrão) nos sobrenadantes de CMSP de indivíduos saudáveis, AR (n=16) ou BR (n=16), no primeiro e no segundo ciclos da sensibilização in vitro com *L. amazonensis*. **A.** IFN γ ; **B.** TNF α ; **C.** IL-10; **D.** IL-5. (p=ns - não significativo).

IL-5 foi encontrada, inicialmente, em baixa quantidade em ambos os grupos (6,2 e 11,2 pg/10⁶ cels. nos grupos AR e BR, respectivamente) e, após a sensibilização, seus níveis aumentaram significativamente (95,7 e 31,6 pg/10⁶ cels. nos AR e BR, respectivamente). Embora tenha ocorrido maior produção nos AR, a diferença entre os dois grupos não foi significativa em nenhum momento (Fig. 5D).

5.2.3 Avaliação das subpopulações linfocitárias

Após a sensibilização in vitro com *L. amazonensis*, não foram observadas diferenças importantes nas subpopulações celulares entre dois grupos. Porém, quando se compara o fenótipo pré e pós-sensibilização em cada grupo, observa-se que após a

sensibilização in vitro com *L. amazonensis* ocorreu uma expansão de células T CD4⁺ (p=0,001) e redução de CD56⁺ (p=0,008), no grupo dos BR. Nos AR a resposta foi diferente, com redução das T CD8⁺ (p=0,008) (Tab. 1).

Tab. 1 – Fenótipo das subpopulações linfocitárias em resposta à *Leishmania* no SSIV: ex-vivo e após sensibilização com *L. amazonensis*. Média ± desvio padrão.

Sub-populações	Alto Respondedor		Baixo Respondedor	
	Pré-sensibilização	Pós-sensibilização	Pré-sensibilização	Pós-sensibilização
CD4 ⁺	36,5 ± 9,1	40,9 ± 12,3	33,2 ± 8,1	43,7 ± 13,0 ^a
CD8 ⁺	20,7 ± 5,7	14,9 ± 7,1 ^b	18,5 ± 8,7	16,8 ± 10,2
CD19 ⁺	20,6 ± 7,5	19,7 ± 7,9	21,5 ± 13,4	21,5 ± 14,4
CD56 ⁺	13,2 ± 6,4	9,9 ± 7,8	14,1 ± 6,5	8,7 ± 5,7 ^c

a- p=0,001; b- p=0,008; c- p=0,008.

Os valores estatísticos acima referem-se à análise entre a frequência pre e pós-sensibilização.

5.3 RESPOSTA IMUNE PÓS-VACINAÇÃO COM *L. AMAZONENSIS*

Com 40 dias e com seis meses, após a vacinação, foram avaliadas a produção de citocinas e a fenotipagem das subpopulações linfocitárias tanto ex-vivo como após

estimulação com promastigotas vivas de *Leishmania amazonensis*. Além disso, foram realizados IDRM e pesquisa de anticorpos séricos específicos, com 40 dias pós-vacinação.

5.3.1 Análise da produção de IFN- γ

Com 40 dias pós-vacinação, verificou-se que ocorreu, em relação à produção de IFN- γ , o mesmo padrão de resposta observado após sensibilização *in vitro*, com altos e baixos-produtores desta citocina (mediana dos AR= 703,9 pg/10⁶cels.; mediana dos BR= 29,2 pg/10⁶cels.), (Fig.6A). Entretanto, na avaliação com 6 meses pós-vacinação, todos os indivíduos BR passaram a produzir IFN- γ em concentrações elevadas (1837 pg/10⁶ cels.), comparáveis às dos AR (Fig. 6A), indicando que nestes indivíduos ocorreu um retardo no estabelecimento da resposta imune mediada por células. Na realidade, seria mais conveniente denominá-los de respondedores lentos (RL) ou respondedores rápidos (RR), em vez de respondedores baixos ou altos, porque indica melhor a cinética da resposta.

5.3.2 Análise das outras citocinas

Os RR produziram, antes da vacina, 114,3 pg de TNF- α / 10⁶ cels, aumentando para 463 pg/10⁶ cels., na primeira avaliação pós-vacinação. Com 6 meses pós-vacinação, observou-se importante redução dos níveis desta citocina (média= 71,2 pg/10⁶ cels.). Nos RL, foi encontrado TNF α , inicialmente, em baixa quantidade (média= 39,4 pg/10⁶ cels.), ocorrendo redução para 16,3 pg/10⁶ cels, no sexto mês após a vacinação (Fig. 6B).

A IL-10 foi observada em alta quantidade (86,6 pg/10⁶ cels.) nos RR, na avaliação pré-vacina, permanecendo alta na avaliação com 40 dias pós-vacinação (média=84,9

pg/10⁶ cels.). Seus níveis caíram significativamente (41,7 pg/10⁶cels.), no 6^o mês após a vacinação (Fig. 6C).

Na avaliação pré-vacina, IL-5 foi produzida em baixas concentrações, em ambos os grupos (média= 4,6 e 12,9 pg/10⁶ cels., nos RR e RL, respectivamente). Após a vacinação, verificou-se um aumento significativo nas concentrações de IL-5, em ambos os grupos, atingindo, no sexto mês, concentrações de 69,3 e 110,7 pg/10⁶ cels, (RR e RL, respectivamente) (Fig. 6D). Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos, em nenhum dos pontos avaliados.

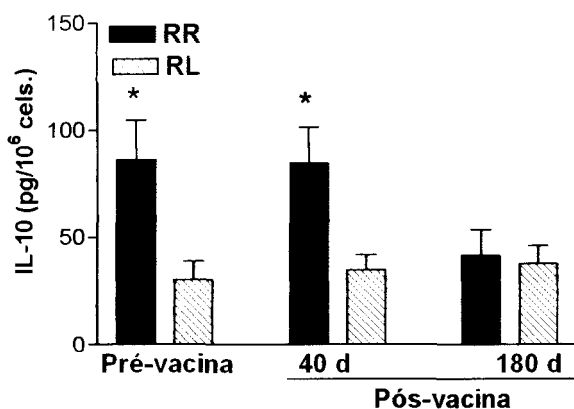


Figura 6 - Produção de citocinas nos sobrenadantes de culturas de CMSP estimuladas com *Leishmania*, de indivíduos vacinados contra leishmaniose, divididos segundo a resposta em respondedor rápido (RR) ou respondedor lento (RL), nas avaliações pré e pós-vacinação. **A.** IFN- γ ; **B.** TNF- α ; **C.** IL-10; **D.** IL-5.

Número de RR e RL = 16, exceto na avaliação pós-vacinação com 180 dias, onde variou entre 12 a 16. Para detalhes vide Anexo 9.8 – 9.11,

* significa $p < 0,005$, na análise entre os dois grupos

5.3.3 Sub-populações linfocitárias

Foram feitas marcações das subpopulações de linfócitos pré e pós-vacinação. As marcações foram feitas das CMSP ex-vivo, e das células após re-estimulação in vitro com promastigotas. Na avaliação de seis meses, pós-vacinação, foram avaliadas as subpopulações somente após a estimulação in vitro.

Antes da vacinação, as frequências das diversas subpopulações, ex-vivo, encontravam-se dentro dos limites da normalidade (Anexo 9.2). Com 40 dias após a vacinação, ocorreu um aumento de células T, refletindo-se nos linfócitos T CD8⁺ de ambos os grupos. Não houve diferença significativa, entre os dois grupos. No entanto, quando se compara a condição ex-vivo, antes da vacina e com a de 40 dias pós-vacinação, verificou-se que os RR apresentaram aumento significativo de células T CD8⁺ ($p=0,03$); (Fig. 7A e Anexo 9.2). Ocorreu aumento praticamente em todos indivíduos estudados, mostrando uma resposta homogênea neste grupo (Fig. 7B). Os RL, embora tenham apresentado aumento dos linfócitos T CD8⁺, não chegou a ser estatisticamente significativo, em virtude da variabilidade na resposta (Fig 7C e D; Anexo. 9.2).

Na avaliação de 40 dias após a vacinação, com a re-estimulação e expansão das células antígeno-específicas, apesar de ter ocorrido aumento das células T CD4⁺ no grupo RR, passando de 35% (ex-vivo) para 41,3%, não foi significativo. Os RL permaneceram com os mesmo percentuais encontrados ex-vivo (36,4%) (Fig. 8). Com seis meses pós-vacinação, enquanto nos RR já se observava uma redução da frequência de células T CD4⁺ para 33%, o grupo de RL atingia o percentual de 43%, semelhante à observada nos RR aos 40 dias pós-vacinação (Fig. 9).

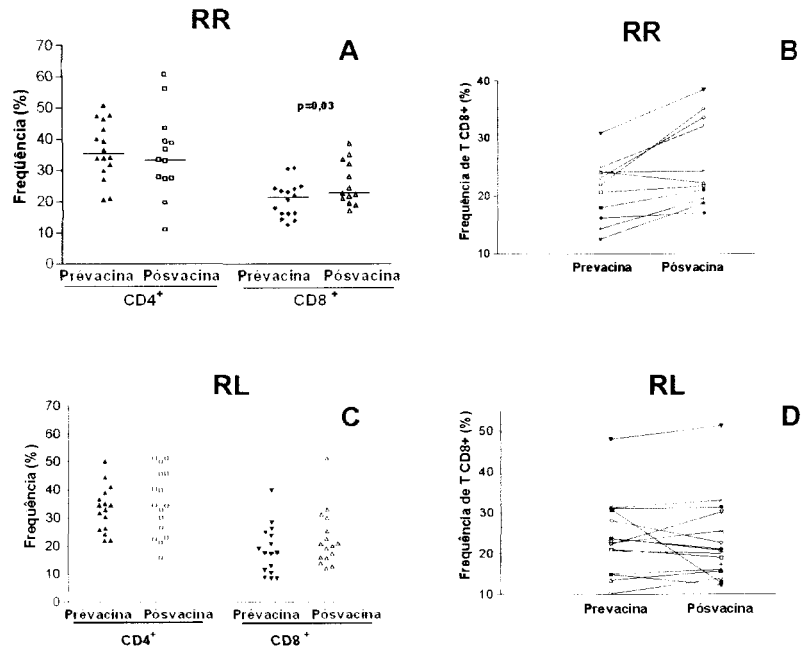


Figura 7 - Subpopulações de linfócitos, avaliados ex-vivo sem estímulo, pre e 40 dias pós-vacinação em voluntários RR (A) ou RL (C). As alterações individuais das frequências de células T CD8⁺ estão mostradas para os RR na fig. B e RL na fig. D.

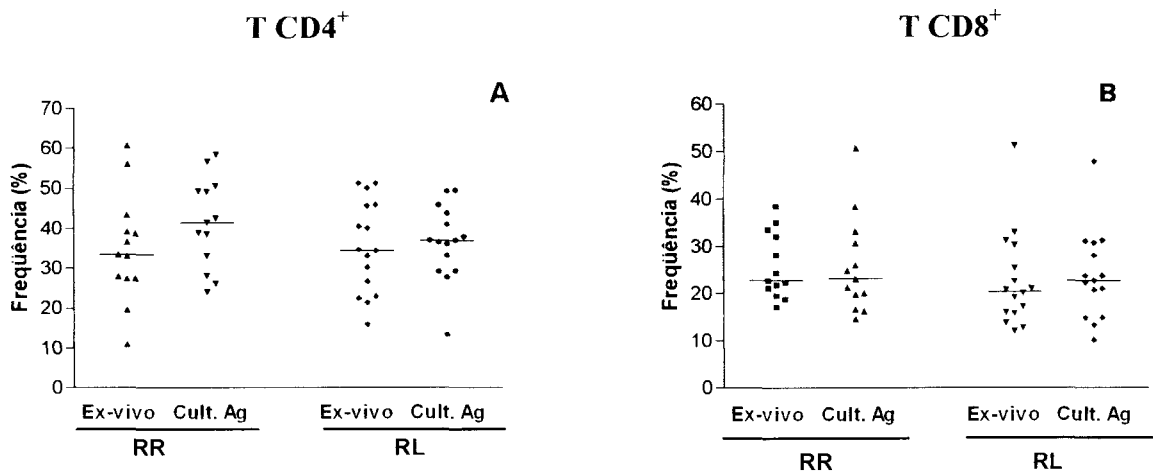


Figura 8 - - Frequência das subpopulações de linfócitos de indivíduos vacinados contra leishmaniose, com 40 dias pós-vacinação, ex-vivo e após re-estimulação in vitro com *L. amazonensis*. A Linfócitos T CD4⁺ em indivíduos RR e RL; B, Linfócitos T CD8⁺ em indivíduos RR e RL.

(RR - n=13; RL - n=15)

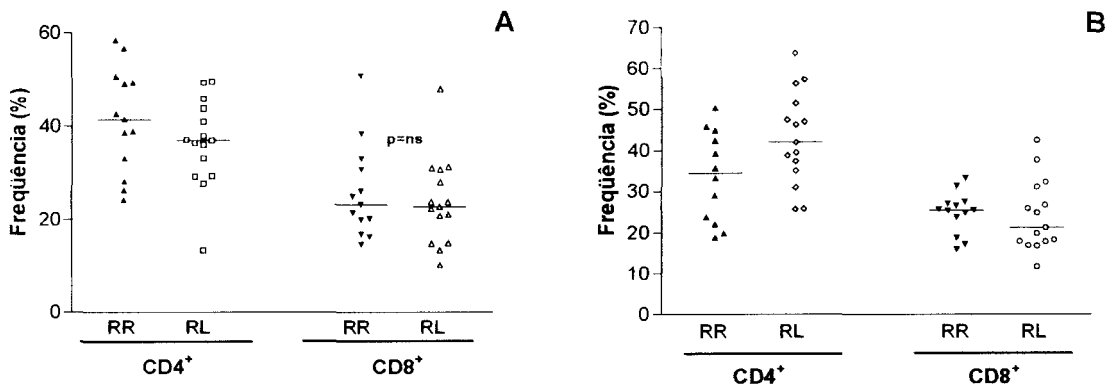


Figura 9 - Frequência das subpopulações de células T CD4+, CD8+, de indivíduos vacinados contra leishmaniose, após re-estimulação *in vitro* com *L. amazonensis*. **A.** Com 40 dias pós-vacinação (RR - n=13; RL - n=15); **B.** Com seis (06) meses pós-vacinação (RR - n=12; RL - n=15).

5.3.4 IDRМ após vacinação contra leishmaniose

Vinte e cinco dos trinta e dois voluntários (78%) apresentaram conversão da IDRМ, após a vacinação (Anexo 9.3; Fig. 10). Nos RR, houve conversão em 12 (75%), e nos RL, 13 (81%), não se observando diferença significativa entre os dois grupos, nem correlação entre o diâmetro da IDRМ com a produção de IFN- γ produzido em sobrenadantes de culturas de CMSP, colhidos no mesmo dia, e re-estimuladas *in vitro* com promastigotas de *L. amazonensis* ($r^2 = 0,006$; $p = ns$).

5.3.5 Produção de anticorpos *Leishmania*-específicos pós-vacinação

Com quarenta dias pós-vacinação, ambos os grupos apresentavam significativa quantidade de anticorpos *Leishmania*-específicos circulantes, 75% dos RR e 69% dos RL apresentavam anticorpos em níveis detectáveis. Com seis meses pós-vacinação, houve uma queda nos níveis de anticorpos específicos em ambos os grupos: 47% dos RR tinham

sorologia positiva e 31% dos RL, no entanto, não houve diferença entre os dois grupos, nos dois momentos avaliados (Fig. 11; Anexo 9.12).

5.4 COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNES: SENSIBILIZAÇÃO IN VITRO VERSUS PÓS-VACINAÇÃO

O padrão da resposta, após sensibilização in vitro, foi semelhante ao observado com 40 dias pós-vacinação. Verificou-se uma superposição de 81,3% dos grupos sensibilizados in vitro (altos ou baixos respondedores), com os sensibilizados pós-vacinação (rápidos ou lentos respondedores). Observou-se, ainda, uma correlação positiva entre a resposta da sensibilização in vitro e a da primeira avaliação pós-vacinação, para IFN- γ ($r^2= 0,46$; $p < 0,0001$; Fig. 12A); para TNF- α ($r^2= 0,34$; $p= 0,0005$; Fig 12B), para IL-5 ($r^2= 0,21$; $p=0,0005$; Fig 12C) e para IL-10 ($r^2= 0,19$; $p= 0,01$; Fig. 12D). Estes resultados sugerem que a resposta imune após sensibilização in vitro com promastigotas vivas foi capaz de prever a resposta inicial pós-vacinação, assim como a do início da sensibilização, indicando que a resposta in vitro parece mimetizar a resposta imune inicial humana in vivo a antígenos de *Leishmania*.

5.5 AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE INICIAL HUMANA CONTRA *LEISHMANIA*

Os dados da sensibilização *in vitro* e após vacinação mostraram que indivíduos saudáveis diferiam em sua resposta inicial à *Leishmania*. Parte dos voluntários apresentou importante secreção de IFN- γ , TNF- α e IL-10, logo nos três primeiros dias de estimulação, enquanto os demais necessitaram de um período de tempo maior para o estabelecimento da resposta imune celular.

Para avaliar possíveis mecanismos implicados nesta diferença, foram feitos ensaios *in vitro*, com bloqueio de IL-4, IL-10 e TGF- β , para verificar se estas citocinas estariam implicadas na resposta observada nos RL. Foi estimada, também, a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ que expressavam receptor de IL-2 (CD25) e de transferrina (CD71), para avaliar a ativação destas células na resposta inicial. Foram feitas também as determinações de IFN- γ e IL-10 intracelulares, em células CD4⁺ e CD8⁺ após o segundo ciclo de sensibilização.

5.5.1 Marcadores de ativação celular, após sensibilização *in vitro*.

Células T sensibilizadas *in vitro*, e estimuladas com promastigotas por quatro dias, foram coradas com dois marcadores de ativação linfocitária, anti-CD25 e anti-CD71, e analisadas por citometria de fluxo. Após sensibilização *in vitro*, não houve diferença na intensidade de ativação das células T CD4⁺, entre RR e RL. No entanto, ambos grupos apresentaram significativa ativação desta subpopulação, manifesta pelo aumento da expressão de CD25, em torno de 10 e 22 vezes nos RR e RL respectivamente, após sensibilização, em relação à condição *ex-vivo*

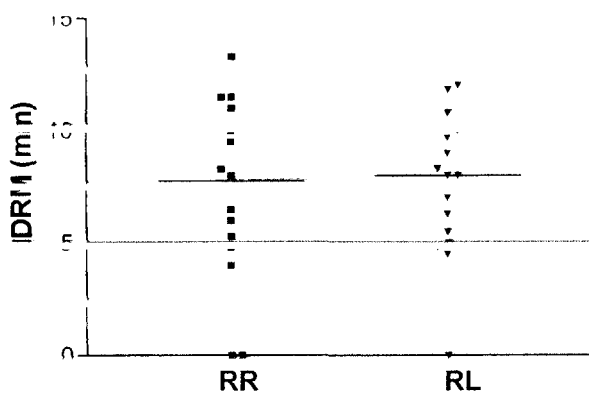


Figura 10. Resultado da Intradermo-reação de Montenegro, realizada com 40 dias pós-vacina, em voluntários RR ou RL.

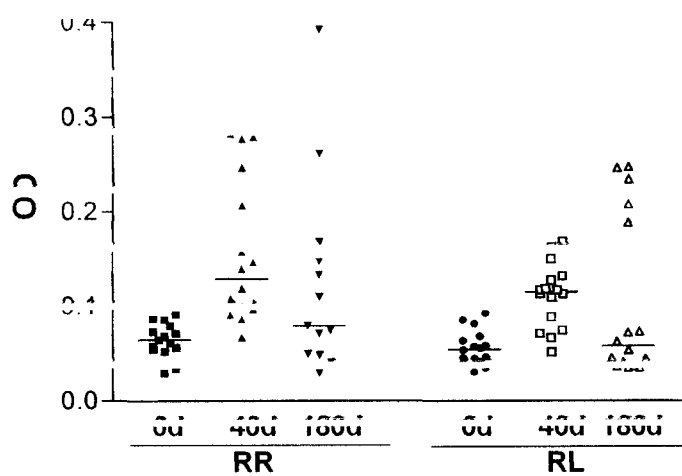


Figura 11 – Quantificação de anticorpos IgG séricos contra antígeno de *L. amazonensis*, por ELISA, em RR ou RL, antes e em dois períodos após vacinação. O ponto de corte foi estabelecido previamente em 0,1.

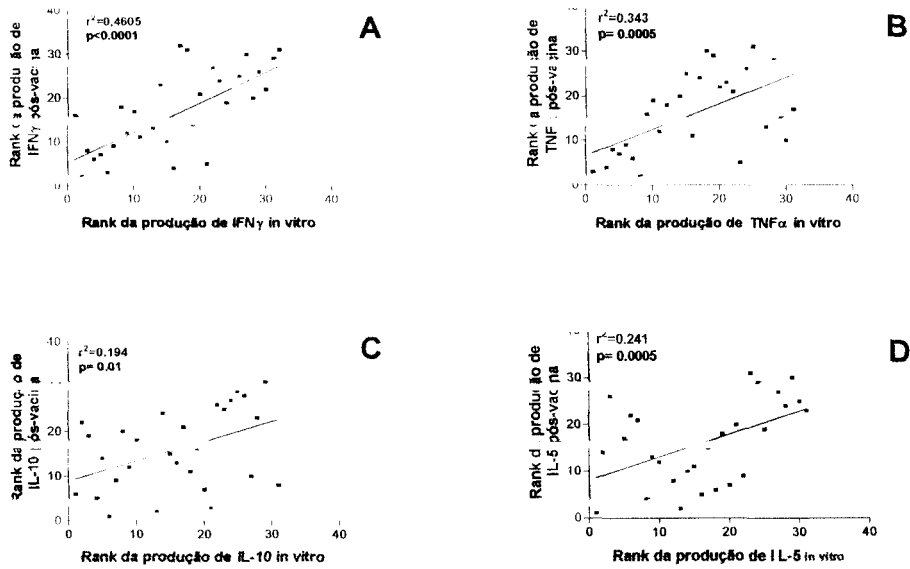


Figura 12 – Correlação linear, em escores, entre a produção de citocinas após sensibilização in vitro com a produção, estimulada por antígeno, 40 dias após vacinação. Cada ponto representa um indivíduo e foram avaliados todos os voluntários analisados A. IFN γ ; B. TNF α ; C. IL-5; D. IL-10.

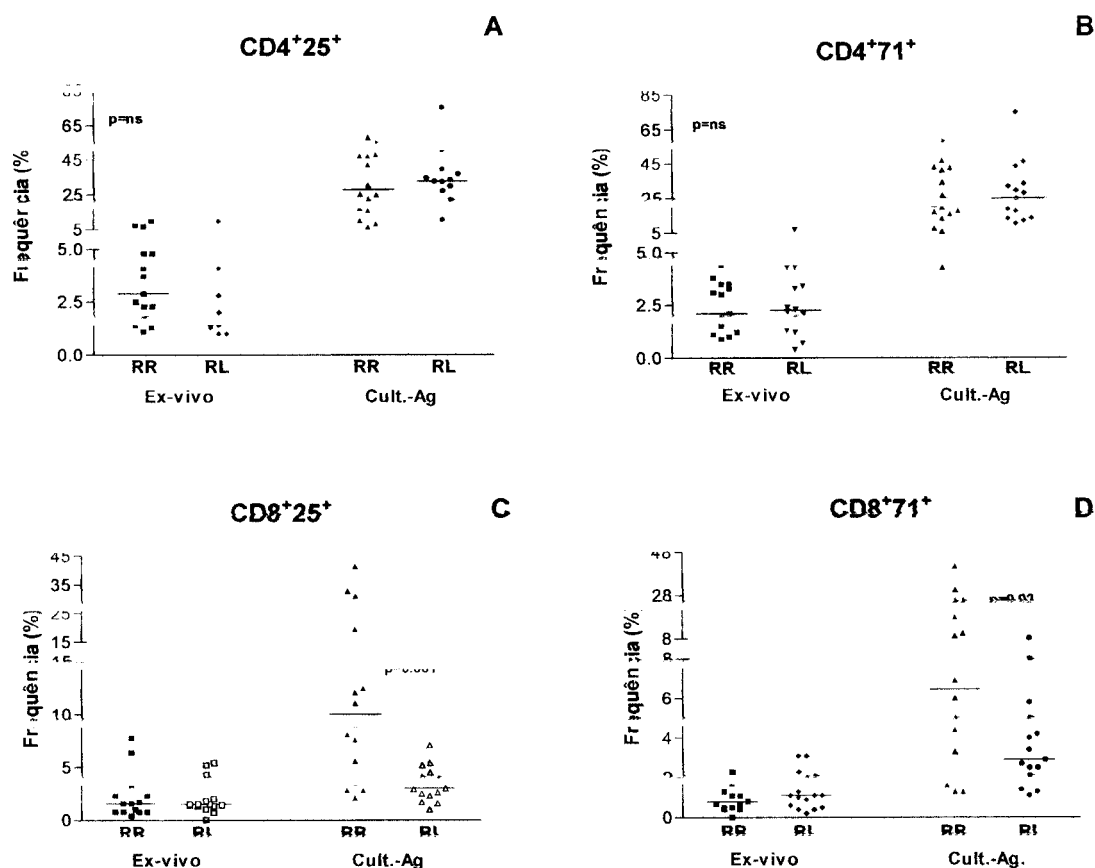


Figura 13 – Ativação celular na sensibilização in vitro. Quantificação de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas nos dois grupos de RR ou RL, no início (Ex-vivo) e no final da sensibilização in vitro (Cult.-Ag). **A.** CD4⁺25⁺; **B.** CD4⁺71⁺; **C.** CD8⁺25⁺; **D.** CD8⁺71⁺.

Por outro lado, com relação às células T CD8⁺, observou-se uma importante diferença entre os dois grupos. Após a sensibilização, no grupo de RR, 14% das células T CD8⁺ expressavam CD25, significando um aumento em torno de 6 vezes, em relação à condição ex-vivo, enquanto que, nos RL somente 3,4% das células T CD8⁺ encontravam-se ativadas, significando um aumento em torno de 2 vezes. A diferença entre os dois grupos foi significativa ($p=0,001$) (Fig. 13C). Observou-se, também, uma maior heterogeneidade na resposta dos RL, diferentemente dos RR (Fig. 13C e 14D). Achados

semelhantes foram observados também com as células T CD8⁺ que expressavam CD71 (Fig. 13D; Fig. 14C e D).

5.5.2 Marcadores de ativação celular após vacinação contra leishmaniose

CMSP colhidas após vacinação, com 40 dias e com 6 meses, foram estimuladas in vitro com promastigotas vivas, por quatro dias. Depois foram marcadas com anti-CD25 e anti-CD71 e analisadas por citometria de fluxo, para avaliação da expressão de CD25 e CD71.

5.5.2.1 Primeira avaliação: 40 dias pós-vacinação

Na avaliação realizada com quarenta dias pós-vacinação, chamou atenção a frequência de linfócitos ex-vivo T CD4⁺ CD25⁺ e T CD4⁺ CD71⁺ ser maior nos RL, do que nos RR ($p=0,005$ e $p=0,01$ para CD25⁺ e CD71⁺, respectivamente). No entanto, estas diferenças não foram mais observadas, após a estimulação in vitro com promastigotas (Fig. 16A e B; Fig. 17A e B).

Com relação aos linfócitos T CD8⁺, a resposta após vacinação apresentou o mesmo comportamento verificado na sensibilização in vitro. Embora não houvesse diferença significativa, entre RR e RL, nos linfócitos ativados ex-vivos, após a estimulação com promastigotas in vitro, ocorreu maior ativação nos RR ($p= 0,02$) (Fig. 16C). Foi observado

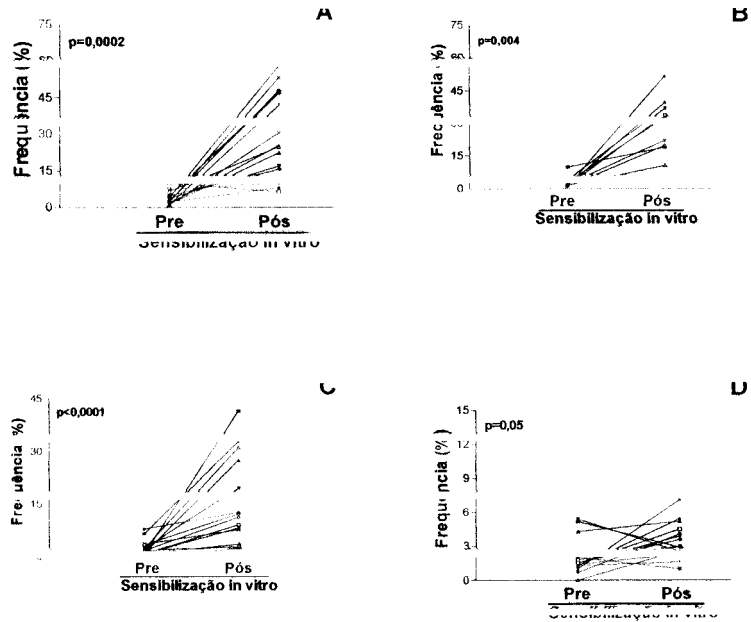


Fig. 14 – Ativação celular na sensibilização in vitro. Comportamento da ativação de linfócitos T, manifesto pela expressão de CD25 de RR ou RL, antes e após a sensibilização in vitro. **A.** T CD4+ em RR; **B.** T CD4+ em RL; **C.** T CD8+ em RR; **D.** T CD8+ em RL.

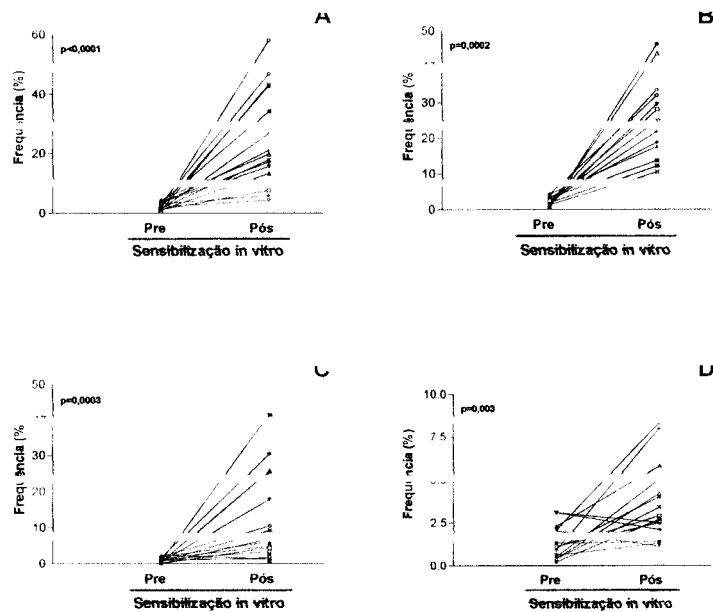


Fig. 15 – Ativação celular na sensibilização in vitro. Comportamento da ativação de linfócitos T manifesta pela expressão de CD71 de respondedores rápidos (RR) ou lentos (RL), antes e após a sensibilização in vitro. **A.** T CD4+ em RR; **B.** T CD4+ em RL; **C.** T CD8+ em RR; **D.** T CD8+ em RL.

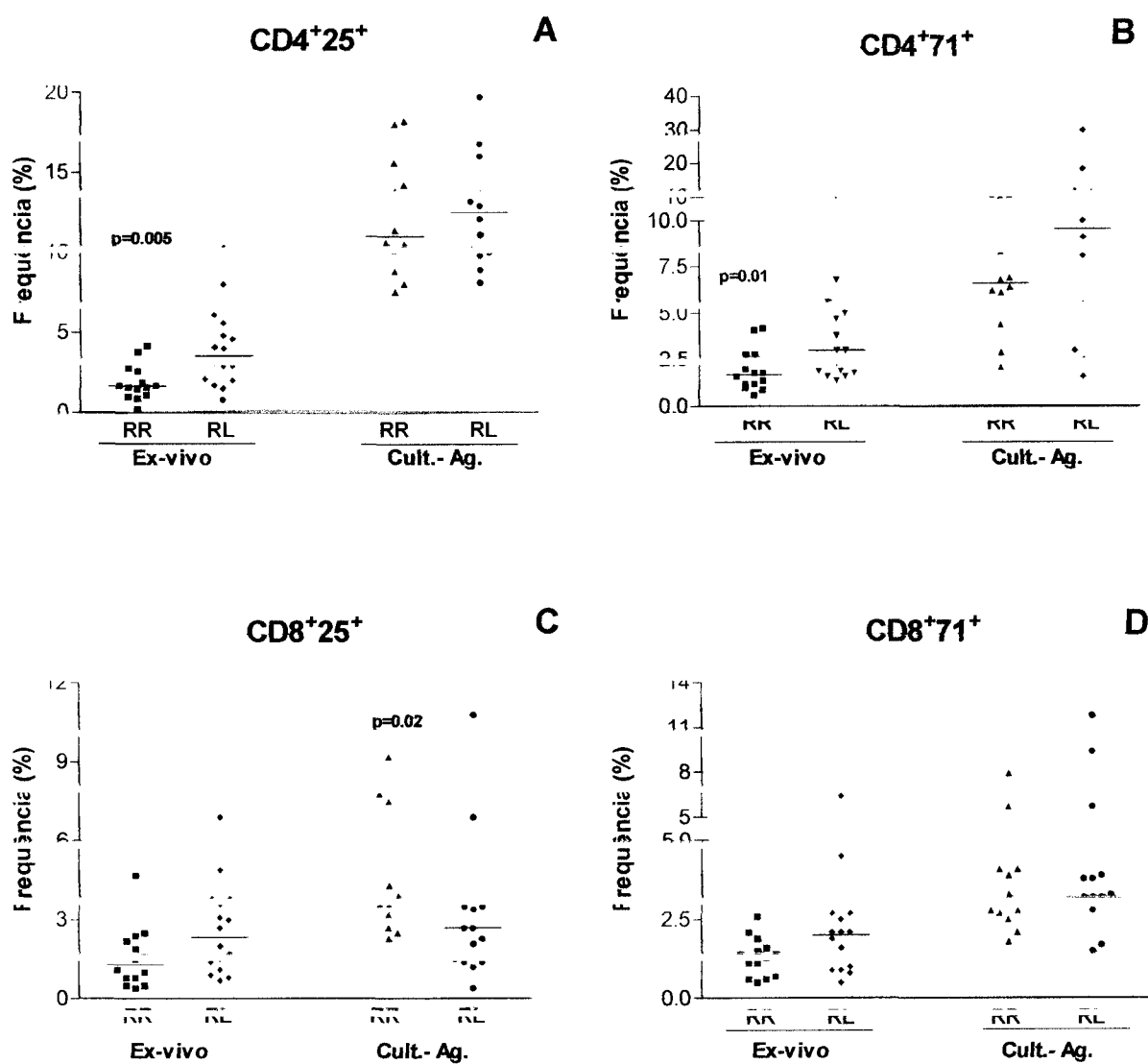


Figura 16 - Ativação celular quarenta dias após vacinação. Quantificação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ ativadas, nos dois grupos respondedores rápidos (RR) ou respondedores lentos (RL), no início (ex-vivo) e com quarenta dias pós-vacinação (Cult.- Ag.), após estimulação com promastigotas. **A.** CD4⁺25⁺; **B.** CD4⁺71⁺; **C.** CD8⁺25⁺; **D.** CD8⁺71.

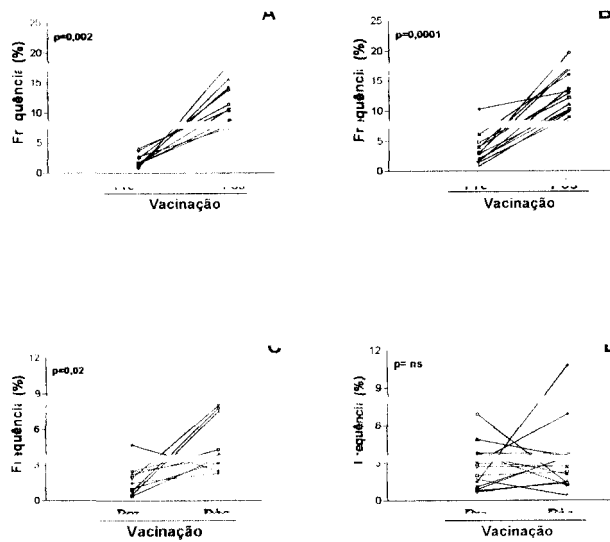


Fig. 17– Ativação celular com quarenta dias pós-vacinação. Comportamento da ativação de linfócitos T manifesta pela expressão de CD25 de respondedores rápidos (RR) ou lentos (RL), antes e com quarenta dias pós-vacinação. **A.** T CD4+ em RR; **B.** T CD4+ em RL; **C.** T CD8+ em RR; **D.** T CD8+ em RL.

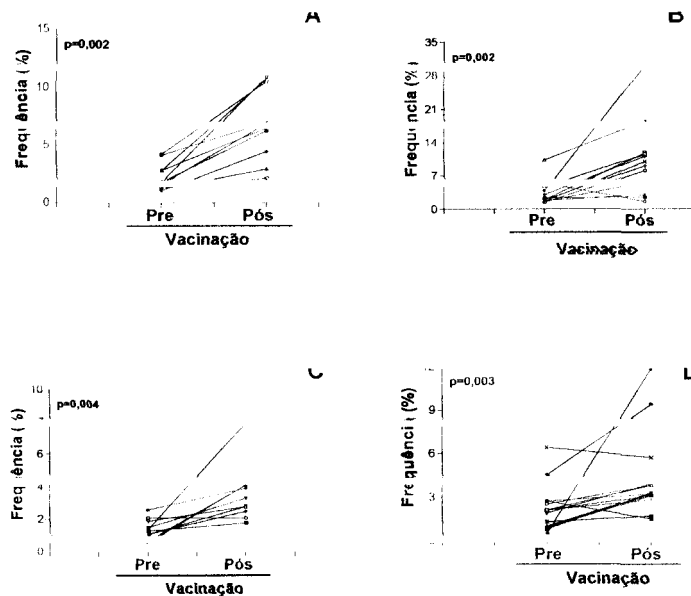


Fig. 18 – Ativação celular com quarenta dias pós-vacinação. Comportamento da ativação de linfócitos T manifesta pela expressão de CD71 de respondedores rápidos (RR) ou lentos (RL), antes e com 40 dias pós-vacinação. **A.** T CD4+ em RR; **B.** T CD4+ em RL; **C.** T CD8+ em RR; **D.** T CD8+ em RL.

aumento em praticamente todos os indivíduos RR avaliados (Fig. 17C). Já no grupo dos RL, houve uma resposta heterogênea na ativação dos linfócitos T CD8+ (Fig. 17D). Não foi verificada diferença na expressão de CD71 (Fig. 16D e 18D).

5.2.2.2 Segunda avaliação: 6 meses pós-vacinação

Na avaliação com seis meses pós-vacinação, não foram detectadas mais diferenças na frequência de linfócitos ativados entre os dois grupos, após cultivo com *Leishmania* (Fig. 19).

5.5.3 Bloqueio de citocinas no ensaio in vitro

Observou-se uma grande variabilidade da resposta ao bloqueio de IL-4, IL-10 e TGF- β , nos voluntários RL. Interleucina-10 foi a citocina cujo bloqueio induziu, com maior frequência, aumento da secreção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de CMSP sensibilizadas com *Leishmania* (Fig. 20, 21 e 22), chegando a aumentá-la em até 13 vezes (Fig. 21A). Porém, observa-se também CMSP de um voluntário RL que não responderam ao bloqueio com nenhum dos anticorpos, nas concentrações utilizadas. A cultura CMSP deste indivíduo apresentava intensa apoptose de linfócitos. Vale salientar que, quando as culturas foram tratadas com os anticorpos isotipos, não houve alteração da produção de IFN- γ em relação às estimuladas só com promastigotas.

Nos indivíduos que responderam com produção de IFN- γ , frente ao bloqueio de citocinas tipo Th2, verificou-se que na segunda estimulação ocorreu aumento na secreção de IFN- γ , mesmo utilizando uma concentração do anticorpo bloqueador 10 vezes menor que a utilizada no primeiro ciclo, ou mesmo sem anticorpo neutralizante. Estes dados

aparentemente indicam que a diferenciação funcional dos linfócitos parece ocorrer já no primeiro dias de sensibilização, como verificado no modelo murino.

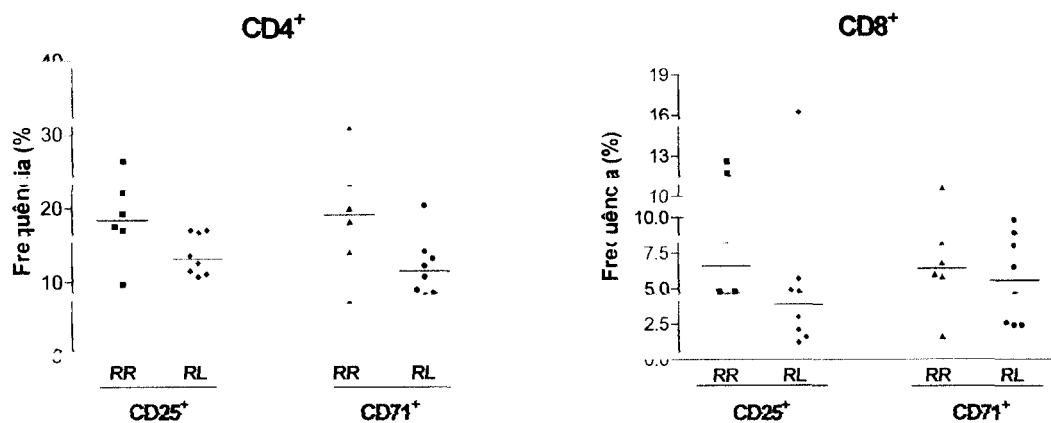


Figura 19 - Ativação celular, seis meses após vacinação. Quantificação de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas nos dois grupos, respondedores rápidos (RR) ou lentos (RL), após estimulação com promastigotas. A. CD4⁺25⁺; CD4⁺71⁺; B. CD8⁺25⁺; CD8⁺71.

Como era de se esperar, a resposta dos voluntários RR, ao bloqueio de citocinas tipo Th2, apresentou maior homogeneidade e menor magnitude, visto que estes indivíduos já produzem IFN- γ em concentrações elevadas (dados não mostrados).

5.5.4 Produção de citocinas intracelulares

Como no período inicial da sensibilização de CMSP de seres humanos, a principal diferença observada no fenótipo linfocitário dos RR e RL foi um aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺ nos RR, interessava estudar o tipo de citocina produzido por esta subpopulação linfocitária, para avaliar se ela poderia estar funcionando como indutora da resposta tipo Th1 observada nos RR.

Foi feita a marcação de IFN- γ e de IL-10 intra-citoplasmáticas, em linfócitos CD4+ e CD8+, de três voluntários RR, no segundo ciclo da sensibilização in vitro, com 4 dias de cultivo. Embora o número de indivíduos estudados seja reduzido, chama atenção o aumento da frequência de linfócitos CD8+ produtores de IFN- γ . Aproximadamente 8% deles apresentavam IFN- γ citoplasmático, o dobro da frequência encontrada nos linfócitos CD4+ (4,0%). Neste momento, observou-se também produção de IL-10 por células CD8+ (4%), embora em menor proporção que a de IFN- γ . Interleucina-10 estava sendo produzida também por linfócitos CD4+ (Fig. 23).

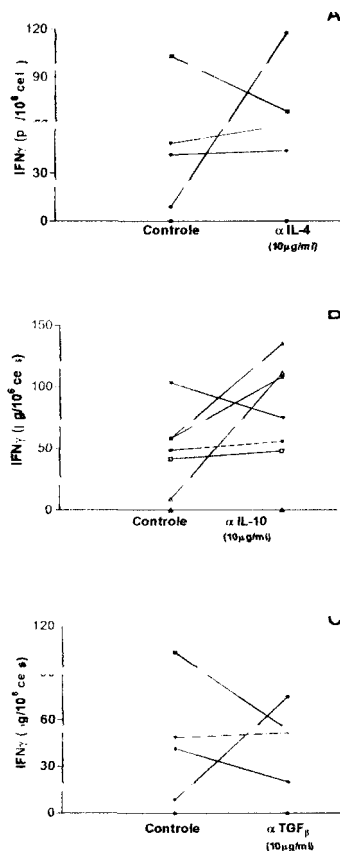


Figura 20 – Produção de IFN- γ por CMSP de indivíduos respondedores lentos, na presença de Ac irrelevante (10 μ g/ml; Controle) ou de Ac. anti-IL-4 (10 μ g/ml; A), anti-IL-10 (10 μ g/ml; B), anti-TGF β (1 μ g/ml; C), no primeiro ciclo de estimulação.

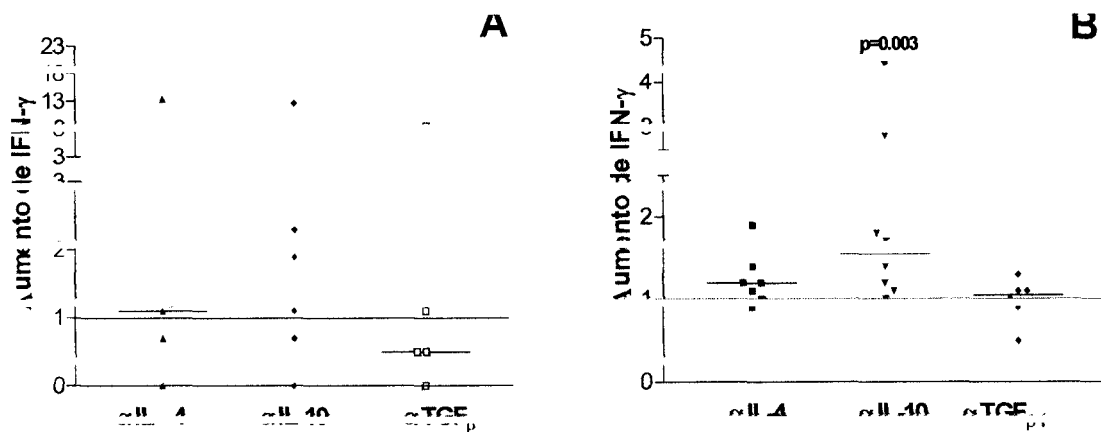
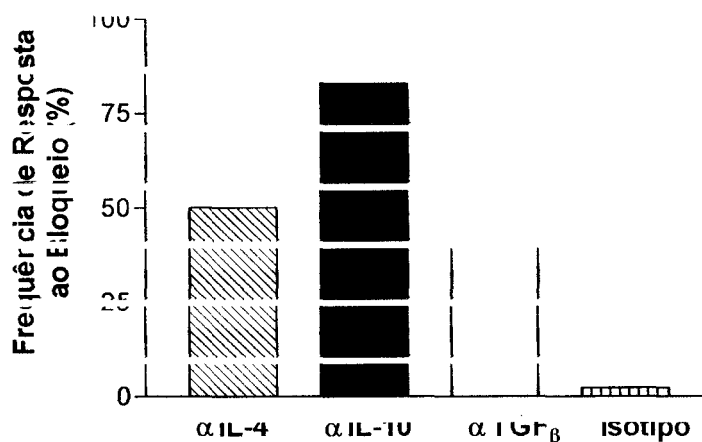


Fig. 21. Resposta de CMSP de voluntários RL ao bloqueio de IL-4 ou de IL-10 ou de TGF- β , expressa pelo aumento da produção de IFN- γ , em relação ao controle com anticorpo isotipo, em culturas de CMSP sensibilizadas in vitro com *L. amazonensis*, e tratadas com anticorpos neutralizantes, no primeiro ciclo de estimulação. **A.** Primeiro ciclo de estimulação - bloqueio realizado com 10 μ g/ml de anticorpos neutralizantes; **B.** Segundo ciclo de estimulação - bloqueio realizado com 1 μ g/ml de anticorpos neutralizantes.

Aumento de IFN- γ = número de vezes de aumento de IFN- γ nas culturas com anticorpos



neutralizantes, em relação ao controle com isotipo.

Figura 22 – Frequência de resposta com aumento da produção de IFN- γ , na primeira estimulação, frente ao bloqueio de citocinas, com anticorpos neutralizantes, anti-IL-4 (10 μ g/ml; n=5), anti-IL-10 (10 μ g/ml; n=7), anti-TGF- β (1 μ g/ml; n=5) ou isotipo (10 μ g/ml; n=7), em culturas de CMSP de voluntários respondedores lentos, sensibilizadas in vitro com *L. amazonensis*.

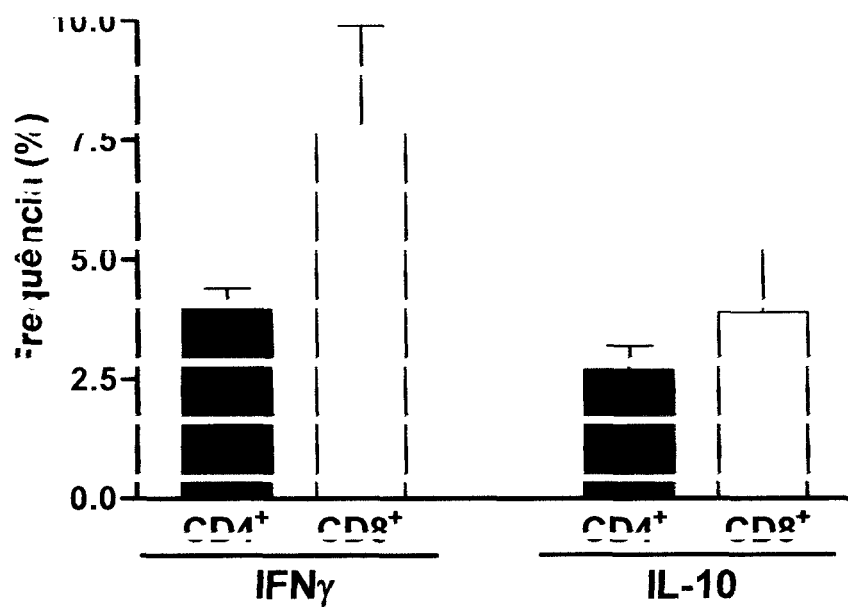


Figura 23 – Proporção de linfócito CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$, de voluntários RR, com produção de IFN- γ e IL-10 intracelular, estimulados por promastigotas vivas de *L. amazonensis*, no segundo ciclo de sensibilização in vitro (n=3).

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi padronizado um SSIV para avaliar a resposta imune inicial, de indivíduos sadios, à promastigotas de *L. amazonensis*. A resposta imune in vivo foi também estudada, através da vacinação com promastigotas mortas pelo calor. Observou-se que houve uma significativa correlação positiva, entre a resposta in vitro e a resposta pós-vacinação mais inicial (40 dias), para todas as citocinas avaliadas. Estes dados indicam que a sensibilização in vitro é capaz de prever a resposta pós-vacinação inicial, e que este SSIV representa um importante instrumento no estudo da imuno-regulação da leishmaniose e na triagem de antígenos para vacinas contra a doença.

Um achado importante foi o de que indivíduos sadios respondem diferentemente frente ao contato inicial com *Leishmania*, tanto in vitro quanto in vivo. Um grupo, correspondendo a 50% deles, já na avaliação pre-vacina, apresentou resposta imune com produção de IFN- γ acima de 100pg/ml (Respondedor Rápido - RR), aumentando a intensidade da resposta, nas avaliações após a vacinação. O outro grupo apresentou pouca ou nenhuma produção de IFN- γ , tanto na avaliação pré como na com 40 dias pós-vacinação. Porém, com 180 dias, no final do estudo, ele apresentou resposta imune, quantitativa e qualitativamente, comparável à do grupo RR, caracterizando um quadro de resposta lenta (Respondedor Lento - RL), frente ao estímulo com *Leishmania*.

É possível que a resposta rápida desenvolvida pelos RR, com produção de grande quantidade de IFN- γ e de TNF- α , leve à ativação de mecanismos leishmanicidas e eliminação do parasito. É de se supor que estes indivíduos sejam capazes de controlar a infecção inicial, sem desenvolver a doença, ou, caso a desenvolvam, tenham cura espontânea. Cura espontânea tem sido relatada em pacientes com LCL por *L. major*

(ZAKRAOUI e cols., 1995), por *L. amazonensis* (HERWALDT e cols., 1992) e por *L. braziliensis* (MARSDEN e cols., 1984; COSTA e cols., 1990; HERWALDT e cols., 1992).

Nos voluntários RL, que desenvolveram resposta sem produção de IFN- γ nem TNF- α nos momentos iniciais da infecção, é possível que, sem ativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, ocorra crescimento do parasito e desenvolvimento da doença crônica, com curso mais indolente. Quadro semelhante foi descrito em camundongos infectados com *T. gondii*, que não apresentam uma resposta Th1 inicial, e, embora posteriormente apresentem produção importante de IFN- γ , não conseguem controlar a infecção (YAP e cols., 2001).

A elevada produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10 nos sobrenadantes de culturas estimuladas por promastigotas, já com setenta e duas horas de cultivo, merece ser discutida. É possível que represente uma resposta imune secundária. Já foi demonstrado previamente que CMSP de indivíduos saudáveis, não expostos previamente, podem responder a antígeno de *Leishmania* com proliferação e secreção de IFN γ , em concentrações elevadas, por vezes comparáveis às de culturas estimuladas com mitógenos (SARAVIA e cols., 1989; KEMP e cols., 1992; AKUFFO & BRITON, 1992; KURTZHALS e cols., 1995). KEMP e cols. (1992) mostraram que a depleção de células CD45RO⁺ das CMSP destes indivíduos abole a resposta induzida por *Leishmania*, enquanto que a depleção de CD45RA⁺ acarreta apenas pequena redução da resposta. Estes dados indicam que as células T, envolvidas nesta resposta, são células de memória, corroborando a hipótese de resposta secundária, possivelmente por reação cruzada com antígenos não relacionados. É possível, também, que a produção inicial elevada de IFN- γ seja produzida pelas células NK, em um mecanismo mais relacionado com resposta inata. Foi também observado que células NK, em maior escala, e células T CD8⁺ participam desta resposta inicial (AKUFFO e cols., 1993). Esta imunidade, não específica, pode contribuir para a

resistência à infecção por *Leishmania* (AKUFFO & BRITON, 1992). Ainda na linha de que a resposta inata está implicada na diferença da produção inicial de IFN- γ , tem sido relatado que IL-18 ou IL-15, citocinas produzidas por macrófagos, podem sinergizar com IL-12, induzindo produção de IFN- γ por células NK, em concentrações elevadas. Esta resposta parece não requerer sensibilização prévia (FEHNIGER e cols., 1999). Visto não ter sido avaliada a produção de IL-18 e de IL-15 neste trabalho, não se pode descartar a possibilidade destas citocinas terem participação na resposta observadas nos RR, o que merece ser avaliado posteriormente.

Vale salientar também que, embora os indivíduos RR avaliados neste trabalho possam apresentar resposta imune decorrente de reações cruzadas com antígenos não relacionados, esta resposta não foi detectada na avaliação pre-vacinação em nenhum dos parâmetros avaliados: sorologia, IDRM e linfoproliferação com sangue total. Ela pode não ter sido detectada, possivelmente devido à baixa frequência de células respondedoras circulantes. KEMP e cols. (1992) observaram que a frequência de células circulantes, respondedoras a antígenos de *Leishmania*, variou de 1:12.000 – 1:98.000, nos indivíduos não expostos. Como no ensaio de linfoproliferação com sangue total utiliza-se o sangue total diluído 1:10 (FIAVEY & FRANKENBURG, 1992), a possibilidade de detectar resposta *Leishmania*-específica em indivíduos não expostos é baixa neste ensaio.

Quanto ao tipo de resposta T desenvolvida, no grupo RR, tanto na avaliação pre-vacinação, como na de 40 dias pós-vacinação, observou-se uma resposta predominantemente tipo Th1, associada a IL-10 alta (Fig. 6A e C). Quantidades significativas de IL-10 e IFN- γ podem ser observadas quando ocorre produção elevada de IL-12 (AKUFFO e cols., 1999). Embora não tenha sido quantificada a concentração de IL-12 nos sobrenadantes de culturas dos voluntários vacinados, nos ensaios feitos com voluntários que não foram vacinados, para o estudo de bloqueio de citocinas, os RR

apresentaram IL-12 em concentrações elevadas (dados não mostrados). Por outro lado, os RR apresentavam também $\text{TNF}\alpha$ elevado, e tem sido evidenciado que $\text{TNF-}\alpha$ pode antagonizar a inibição mediada pela IL-10, sugerindo que dependendo do estímulo ativador, a presença de IL-10 pode não resultar em anergia (BROSSART e cols., 2000). Mais tarde, com seis meses pós-vacinação, observou-se, neste grupo, resposta Th1 com aumento de Th2 (Fig. 6D). O aumento de IL-10, nos dois primeiros pontos avaliados, e a resposta tipo Th2, detectada na última avaliação, possivelmente podem ser atribuídos a mecanismos reguladores da resposta imune, para manter a homeostasia do sistema, inibindo resposta lesiva decorrente da produção alta de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ (FIORENTINO e cols., 1989; WAGNER e cols., 1991; PALUDAN, 1998; JOSS e cols., 2000).

Chama atenção o comportamento da produção de $\text{TNF-}\alpha$ nos voluntários do grupo RR, na avaliação pós-vacinação. Ela estava aumentada, com 40 dias pós-vacinação (média=463 pg/ 10^6 cels.) e caiu na avaliação com seis meses pós-vacinação, não acompanhando o comportamento do $\text{IFN-}\gamma$ (Fig. 6B), que permanece aumentado. A dissociação da produção de $\text{TNF-}\alpha$ e de $\text{IFN}\gamma$, neste estudo, pode ser decorrente do fato do $\text{TNF-}\alpha$ ser uma citocina pro-inflamatória, tendo sua regulação mais precoce, para evitar danos teciduais, decorrentes de uma resposta inflamatória exacerbada. Uma outra possibilidade, que se deve afastar, é a de que o aumento verificado com 40 dias pós-vacinação poderia ser decorrente de contaminação do meio com LPS bacteriano. Esta possibilidade fica afastada, porque quando se avaliam as concentrações desta citocina nos sobrenadantes das culturas com células não estimuladas, todas apresentavam baixas concentrações (média = 10pg/ml). O mesmo meio foi usado para os RL. Outra possibilidade, é que poderia ser decorrente de contaminação nas promastigotas. Esta possibilidade, embora não possa ser afastada categoricamente, parece pouco provável, porque as culturas eram mantidas por quatro dias a 37°C , tempo suficiente para haver

crescimento bacteriano detectável ao exame microscópico de rotina, realizado antes da coleta das células, a não ser em casos de contaminação com *Mycoplasma*, que não foi avaliada neste trabalho (ROWE e cols., 1998). Além disso, os mesmos parasitos foram utilizados nas culturas dos RL. Uma outra situação em que pode ocorrer elevação do TNF- α , é após atividades físicas extenuantes (PEDERSEN, 2000). O aumento de TNF- α encontrado aqui, não parece ser decorrente desta variável, por não ter sido observado aumento de suas concentrações nos voluntários RL, que estavam submetidos às mesmas atividades físicas que os RR.

Em relação ao tipo de resposta imune desenvolvida pelos RL, chama atenção a não produção de IFN- γ , TNF- α , associado à presença de IL-10 e baixas concentrações de IL-5 nos momentos iniciais e com potente resposta Th1 mais tardiamente (Fig. 6A e 6D). Esses dados sugerem um quadro de supressão periférica, porque se observava aumento da subpopulação de linfócitos T CD4+, sem produção de citocinas tipo Th1 e baixa do tipo Th2. Essa produção limitada, ou mesmo inexistente, de citocinas neste período inicial, sugerem que, nestes indivíduos, a exposição a antígenos de *Leishmania* induz um estado de imunossupressão periférica dos linfócitos T, com células B responsivas, visto que a produção de anticorpos específicos foi comparável à do grupo RR (Fig. 9), em todos os momentos avaliados.

Algumas condições são descritas como indutoras de supressão de células T. Uma possibilidade pode ser decorrente de co-estimulação insuficiente ou ausente, o que resultaria no bloqueio da via Ras/MAP cinase, que, por sua vez inibiria a formação de IL-2. Neste caso, ocorre também ausência de produção de IL-3, TNF- α e redução da produção de IFN- γ (SCHWARTZ, 1999). BRODSKY e cols. (2001) mostraram que as moléculas B7 (CD80 e CD86) e CD40 são importantes para a produção de IFN- γ , na infecção inicial *in vitro*. No entanto, ainda é desconhecido o papel destas moléculas coestimulatórias na

resposta dos RL. Uma outra possibilidade, é que esta resposta seja decorrente de estimulação com antígeno de baixa afinidade, o que resultaria numa sinalização subótima dos receptores de célula T, suficiente para induzir os inibidores da via Ras, mas não adequada para produzir IL-2 (SLOAN-LANCASTER e cols., 1994; SCHWARTZ, 1999). Uma ligação de baixa afinidade entre o antígeno e o receptor de célula T pode acontecer, por diferença sutil na estrutura do peptídeo antigênico (PLEBANSKI e cols., 1999) ou pela apresentação por diferentes moléculas MHC classe II (BOYTIM e cols., 2000; RACIOPPI e cols., 1993). Ambas as condições podem modular seletivamente funções das células T efetoras e causar uma supressão transitória. A reversão do quadro anérgico geralmente ocorre meses depois, após a degradação do antígeno.

Nas amostras ex-vivo, antes da vacinação, não se observou diferença entre os dois grupos, quanto à frequência de células T CD4+CD25+ (Fig. 13A), no entanto com 40 dias pós-vacinação, ocorreu um aumento significativo destas células (ex-vivo) nos RL (Fig. 16A). Isto sugere que a supressão inicial induzida pela vacina pode ser mediada por células T CD4+CD25+ regulatórias.

A supressão exercida por células T anérgicas supressoras pode ser mediada por mais de um mecanismo, quer através de citocinas, como IL-10, TGF β ou através da indução de apoptose (SAKAGUCHI e cols., 1995; THORNTON & SHEVACH, 1998; KUNIYASU e cols., 2000; TAAMS e cols., 2000; VENDETTI e cols., 2000; GROUX, 2001; SHEVACH, 2001).

Para investigar se a supressão periférica observada nos RL era mediada por citocinas tipo Th2, ou por células anérgicas supressoras, visto que IL-10 estava aumentada nos primeiros momentos (Fig. 6C), realizamos ensaios de bloqueio da atividade de citocinas in vitro, com anticorpos neutralizantes (anti-IL-10, anti-IL-4 ou anti-TGF- β). A resposta, frente aos anticorpos bloqueadores, foi muito heterogênea, variando desde

ausência de resposta, como observado em um voluntário, a um aumento de até 13 vezes na produção de IFN- γ , sugerindo que a supressão parece ser multifatorial e espectral. IL-10 foi a citocina que teve ação mais relevante, no bloqueio da produção de IFN- γ . (Fig.21 e 19). Este achado mostra correlação com a produção de IL-10 aumentada, após sensibilização *in vitro* e *in vivo*.

Embora anti-IL-10 também aumente a produção de IFN- γ em culturas de CMSP de pacientes com LCL, esta resposta, embora significativa, é também heterogênea (ROCHA e cols., 1999), sugerindo, mais uma vez que esta anergia inicial parece ser multifatorial. Os mecanismos envolvidos nesta anergia merecem ser melhor estudados.

A proporção de indivíduos RL assemelha-se à de pacientes com LTA que desenvolvem supressão transitória nos primeiros meses da doença. Como observado por ROCHA e cols. (1999), aproximadamente 40% dos pacientes com LTA, avaliados com até três meses de doença, não apresentam produção de IFN- γ . Porém, com seis meses de evolução, estes pacientes produzem IFN- γ em concentrações elevadas, comparáveis à dos que produzem esta citocina desde o início da doença.

Analisando os resultados de proteção observados nos ensaios clínicos da vacina contra leishmaniose (ANTUNES e cols., 1986; ARMIJOS e cols., 1998), observa-se que a taxa de proteção foi muito variável. Embora a maioria dos ensaios clínicos realizados com a vacina, na América do Sul, não tenha sido bem controlado, um outro fator que pode estar contribuindo para os achados variáveis pode ser o fato da supressão transitória induzida pela vacina. Assim, parte dos indivíduos vacinados fica mais susceptível de se infectar se a vacina tiver sido aplicada em período de transmissão da doença.

NASCIMENTO e cols. (1990) e MENDONÇA e cols. (1995) já tinham descrito que a vacina contra leishmaniose induzia o aumento de células T CD8+. No entanto, neste nosso estudo, foi possível observar que ocorreu aumento somente nos indivíduos RR, na

avaliação com 40 dias pós-vacinação. Este aumento estava associado a uma significativa elevação da ativação destes linfócitos T CD8+, manifesta pela maior frequência de linfócitos T CD8+ expressando marcadores de ativação, como o receptor de IL-2 (CD25) e/ou receptor de transferrina (CD71) (Fig. 15C e D). A diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa, para estes dois parâmetros. Aumento semelhante foi observado também no final da imunização in vitro (Fig. 13 C e D). Nossos dados sugerem que linfócitos CD8⁺ parecem desempenhar papel relevante na resposta imune inicial dos indivíduos RR, após imunização contra *Leishmania*.

Para avaliar o papel das células T CD8+, foi feita a marcação de IFN- γ e de IL-10 intracitoplasmáticas, em linfócitos CD4+ e CD8+, nos voluntários RR. No final da imunização in vitro, chamou atenção o aumento relativo de linfócitos CD8+ produtores de IFN- γ . Com quatro dias de sensibilização, aproximadamente 8% dos linfócitos CD8+ apresentavam IFN- γ citoplasmático, o dobro da frequência encontrada nos linfócitos CD4+ (4,0%) (Fig. 23). Uma limitação de nossos dados foi o fato de não ter sido feito a diferenciação entre as diversas subpopulações que expressam CD8. Como não foi possível diferenciar células T das NK-T e das NK, nos ensaios de detecção de citocina intracelular neste trabalho, não podemos afastar a possibilidade destas duas últimas subpopulações estarem envolvidas na produção inicial de IFN- γ na resposta dos RR. Embora os linfócitos T CD4+ sejam a maior fonte de IFN- γ (KEMP e cols., 1999; ADJARY e cols., 2000; BOTTREL e cols., 2001), células T CD8+ podem produzir quantidades significativas de IFN- γ na leishmaniose cutânea murina (CHAN, 1993). Nossos dados sugerem uma possível participação dos linfócitos T CD8+ na produção inicial de IFN- γ , como tem sido observado em infecção bacteriana (LERTMEMONGKOLCHAI e cols., 2001). Uma outra possibilidade, que não pode ser afastada, é a de que essa produção de IFN- γ pelos linfócitos CD8+ nos RR pode ser decorrente da ativação das T CD4+.

O papel dos linfócitos T CD8+ parece ser fundamental para: a) evitar a disseminação do parasito nos primeiros dias de infecção (LASKAY e cols., 1995); b) inibir a produção de IL-4 e IL-13, e induzir a produção de IL-12 e resposta tipo Th1 (SCOTT, 1991; REINER e cols., 1995). AKUFFO e cols. (1993) já tinham demonstrado que a produção inicial de IFN- γ em indivíduos não expostos é atribuída principalmente às células NK e, em menor proporção, às T CD8+. Já está bem estabelecido que linfócitos T CD8+ participam do mecanismo imune efetor na eliminação do parasito, através da liberação de citocinas e da atividade citotóxica (MULLER e cols., 1991, 1993 e 1994; CHAN, 1993; CONCEIÇÃO SILVA e cols., 1998; HARTY e cols., 2000). Em nossos dados não avaliamos citotoxicidade, mas na leishmaniose humana foi demonstrada atividade citotóxica importante em pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa (BRODSKYN e cols., 1997), assim como após sensibilização in vitro com *Leishmania*, de voluntários não expostos (RUSSO e cols., 1998).

Tem sido descrito, no sistema imune, um mesmo tipo celular exercendo atividade estimulatória e inibitória. As células NK, inicialmente, estimulam a produção de IL-12 e elas participam também da regulação inibitória desta citocina, através da produção de IFN- α ou IFN- β e de NO-sintetase tipo2 (DIEFENBACH e cols., 1998; HUANG e cols., 1998; BOGDAN e cols., 2000), regulando a concentração de IL-12 no microambiente, e contribuindo para a homeostasia do sistema. Aparentemente, neste trabalho, as células T CD8+ parecem exercer diferentes papeis na infecção por *Leishmania*. Outro papel possível parece ser o de imuno-modulação, através da produção de IL-10 e de citotoxicidade dependente de Fas, na modulação dos efeitos nocivos da produção excessiva de IFN- γ e de TNF- α . Após a imunização in vitro, dentre os linfócitos CD8+, 3,9% apresentavam IL-10 citoplasmática. É possível que as células T sejam uma das fontes desta citocina, observada em concentrações elevadas nos sobrenadantes de culturas dos RR, nos dois primeiros

pontos. É importante salientar que o comportamento das células T CD8⁺ ativadas correlaciona-se com a produção de IL-10, antes e após a vacinação. Tem sido descrita a expansão de células T co-produzindo IL-10 e IFN γ , em resposta à infecção por *L. donovani* (KEMP e cols., 1999b). Novos ensaios, avaliando a cinética de produção de IFN- γ e de IL-10, na imunização in vitro, a se ocorre citotoxicidade tornam-se necessários para esclarecer melhor o papel das células T CD8⁺ na imuno-regulação da infecção humana por *L. amazonensis*.

Alguns trabalhos mostram que a apoptose, mediada por Fas (HUANG e cols., 1998; CONCEIÇÃO-SILVA e cols., 1998) ou por TNFRp55 (VIEIRA e col., 1996; KANALY e cols. 1999) é necessária para o controle do infiltrado inflamatório, após a eliminação do parasito (CONCEIÇÃO SILVA e cols., 1998; KEMP e cols., 1999b; HARTY e cols., 2000). Na infecção tardia, as células T CD8⁺ têm também papel fundamental na manutenção da memória imunológica (MULLER, 1992). O aumento de células T CD8⁺ tem sido relatado, em pacientes com LTA tratados e curados assim como em indivíduos sadios vacinados (DA-CRUZ e cols., 1994; COUTINHO e cols., 1996; GAAFAR e cols., 1999).

Embora sejam inúmeras as evidências de que linfócitos T CD8⁺ são importantes no controle da infecção por *Leishmania*, alguns trabalhos, no entanto, mostram que camundongos deficientes de células T CD8⁺ (HUBER e cols., 1998) ou de T CD8⁺ funcionais, pela deleção do gene da molécula de β 2-microglobulina (OVERATH e cols., 1993), controlam a infecção do mesmo modo que os seus controles selvagens. Embora estes dados indiquem que os linfócitos T CD8⁺ não são relevantes no controle da infecção por *Leishmania*, deve-se ter em mente que o sistema imune apresenta diversos mecanismos redundantes, e que na ausência de um, outros mecanismos compensatórios alternativos são

ativados (NOBEN-TRAUTH e cols., 1996, 1999; TAYLOR & MURRAY, 1997; DAVID & WANG, 1999).

A IDRМ tem sido amplamente utilizada como um excelente teste diagnóstico de leishmaniose, indicando infecção prévia ou ativa. Na LV, a positividade na IDRМ tem sido interpretada como um bom marcador de proteção. Pacientes com LV ativa apresentam IDRМ negativa (REED e cols., 1986), que se torna positiva com a cura da doença (BADARÓ & DUARTE, 1996). Na LCL e na LCM, a IDRМ apresenta correlação direta com tempo de doença, mas a correlação positiva entre IDRМ e proteção não se verifica de modo tão linear como na LV. Embora pacientes com LCD, a forma anérgica apresenta IDRМ negativa (BRYCESON, 1970; BARRAL e cols., 1995) e pacientes curados de LC apresentam IDRМ positiva e são resistentes à reinfecção, contudo, pacientes com LC apresentam IDRМ positiva com 2 a três meses de evolução (BARRAL e cols., 1995a), ainda com doença ativa. Neste caso a conversão do teste não está associada à proteção. Pacientes com LCM, refratária a tratamento, apresentam IDRМ fortemente positiva, embora não controlem a infecção. Aqui, também, ela não se associa à proteção.

A IDRМ tem sido usada, também, para o acompanhamento em estudos de vacina e a conversão do teste, pós-vacinação, tem sido lida como indicação de proteção da vacina. Aqui, alguns pontos merecem ser discutido. Nos nossos dados, 75% dos RR e 81% dos RL apresentaram IDRМ positiva com 40 dias pós-vacinação, não sendo possível distinguir RR de RL pela IDRМ. O IFN- γ tem sido considerada uma citocina característica de resposta protetora, tipo Th1. Nos nossos dados, não houve correlação positiva entre a produção de IFN- γ e o diâmetro ou conversão da IDRМ, nos voluntários vacinados contra leishmaniose. A resposta do teste cutâneo ao BCG não se correlaciona com a produção de IFN- γ , pelas CMSP estimuladas com *M. tuberculosis*, após revacinação com BCG (BARRAL-NETTO, comunicação pessoal). MACPHEE e cols. (1993) fizeram uma análise

funcional e fenotípica das células recuperadas de testes cutâneos para PPD ou *Candida*. De particular interesse foi a observação de que as células recuperadas podem ser tipo Th1 ou Th2, e que o tipo de diferenciação depende do tipo do antígeno e de outros fatores, como o tempo de evolução da doença. Indivíduos sadios podem responder a antígenos de toxóide tetânico com diferenciação de células tipo Th1. No sítio do teste cutâneo, no entanto, em pacientes com hanseníase tuberculóide ocorre indução de células tipo Th2. Aparentemente as células atraídas para o sítio de inoculação do antígeno na derme, reconhecem o antígeno, mas podem ser linfócitos tipo Th1 ou Th2, não indicando necessariamente proteção. Embora mereça um estudado mais criterioso, esses dados, em conjunto, sugerem que a IDRM parece ser preferencialmente um indicador de sensibilização, ou de exposição aos antígenos de *Leishmania* e não de proteção.

Em resumo, este trabalho mostrou que: a) indivíduos sadios, sem contato prévio com *Leishmania*, apresentam potente resposta imune, predominantemente tipo Th1, na sensibilização com promastigotas vivas. No entanto, eles diferem na interação inicial, 50% deles apresentam resposta rápida (RR), enquanto os demais apresentam resposta lenta (RL); b) nos voluntários RR, verificou-se um aumento significativo da ativação das células T CD8⁺ na resposta inicial, *in vitro* e *in vivo*, com produção de IFN- γ e/ou IL-10. É possível que elas possam participar da produção inicial de IFN- γ e/ou da modulação da resposta tipo Th1, através da secreção de IL-10; c) os mecanismos de bloqueio na produção de IFN- γ , nos RL, parecem ser multifatoriais; d) o sistema de sensibilização *in vitro* utilizado neste estudo tem a capacidade de prever a resposta de sensibilização pós-vacinação. Isto indica que este sistema de sensibilização *in vitro* significa um importante instrumento no estudo da imuno-regulação da leishmaniose e na triagem inicial de antígenos para vacina. Além disso, a triagem de antígenos imunogênicos, num sistema *in*

vitro, apresenta vantagens quanto à segurança dos voluntários, aos custos e à comparação de mais de um antígeno, na mesma população.

7 CONCLUSÕES

1. O sistema de sensibilização *in vitro*, utilizado neste estudo, tem a capacidade de prever a resposta de sensibilização pós-vacinação;
2. Indivíduos não expostos à *Leishmania* diferem na resposta imune inicial, *in vitro* e *in vivo*;
3. Parte dos indivíduos sadios, sem contacto prévio com *Leishmania*, apresenta potente resposta imune, predominantemente do tipo Th1, na sensibilização com promastigotas, enquanto a outra parte apresenta um período transitório de anergia, respondendo, mais tardiamente de modo semelhante aos demais;
4. As células T CD8⁺ parecem exercer papel importante nos eventos iniciais da infecção por *Leishmania* nos indivíduos respondedores rápidos, possivelmente participando na produção inicial de IFN- γ e/ou posteriormente na modulação da resposta tipo Th1;
5. A anergia inicial observada nos indivíduos RL parece ser multifatorial, com participação relativa de IL-4, IL-10 e TGF- β e possivelmente de outros mecanismos não abordados no escopo deste trabalho;
6. O aumento de células T CD4⁺CD25⁺ (*ex-vivo*) nos indivíduos RL, associado ao aumento de IL-10 após a vacinação, sugerem que esta anergia possa ser mediada por T regulatória CD4⁺CD25⁺.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F.G. Development of Vaccines against Human Parasitic Diseases: Tools, Current Status and Perspectives. **Expert. Opin. Investg. Drugs**, 9:301-10, 2000.

AEBISCHER, T.; WOLFRAM, M.; PATZER, S.I.; IL,G. T.; WIESE, M.; OVERATH, P. Subunit Vaccination of Mice Against New World Cutaneous Leishmaniasis: Comparison of Three Proteins Expressed in Amastigotes and Six Adjuvants. **Infect. Immun.**, 68:1328-36, 2000.

AJDARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, M.H.; ESLAMI, M.B.; KEMP, K.; KHARAZMI, A. Comparison of the Immune Profile of Nonhealing Cutaneous Leishmaniasis with Those with Active Lesions and Those Who Have Recovered from Infection. **Infect. Immun.**, 68:2000. Pag???

AKIRA, S. The role of IL-18 in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, 12:59-63, 2000.

AKUFFO, H.O.; BRITTON, S.F. Contribution of non-*Leishmania*-specific Immunity to Resistance to *Leishmania* Infection in Humans. **Clin. Exp. Immunol.**, 87:58-64, 1992.

AKUFFO, H.; MAASHO, K.; HOWE, R. Natural and Acquired Resistance to *Leishmania*: Cellular Activation by *Leishmania aethiopica* of Mononuclear Cells from Unexposed Individuals is through the Stimulation of Natural Killer (NK) Cells. **Clin. Exp. Immunol.**, 94:516-21, 1993.

AKUFFO, H.; ALEXIS, A.; EIDSMO, L.; SAED, A.; NYLÉN, S.; MAASHO, K. Natural Killer Cells in Cross-Regulation of IL-12 by IL-10 in *Leishmania* Antigen-Stimulated Blood Donor Cells. **Clin. Exp. Immunol.**, 117:529-34, 1999.

ALMEIDA, R.P.; BARRAL-NETTO, M.; DE JESUS, A.M.;DE FREITAS, L.A.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A. Biological Behavior of *Leishmania amazonensis* Isolated from Humans with Cutaneous, Mucosal, or Visceral Leishmaniasis in BALB/C Mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 54:178-84, 1996.

ANTUNES, C.M.F.; MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A.; COSTA, C.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.M.; WILLIAMS, P.; LIMA, A.O.; VIEIRA, B.F.; SCHETTINI, A.P.M. Controlled Field Trials of Vaccine Against New World Cutaneous Leishmaniasis. **Int. J. Epidemiol.**, **15**:572-80, 1986.

ARMIJOS, R.X.; WEIGEL, M.M.; AVILES, H.; MALDONADO, R.; RACINES, J. Field Trial of a Vaccine Against New World Cutaneous Leishmaniasis in an At-Risk Child Population: Safety, Immunogenicity, and Efficacy During the First 12 Months of Follow-Up. **J. Infect. Dis.**, **177**:1352-7, 1998.

ARNOLDI, J.; MOLL, H. Langerhans cell Migration in Murine Cutaneous Leishmaniasis: Regulation by Tumor Necrosis Factor alpha, Interleukin-1 beta, and Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha. **Dev. Immunol.**, **6**:3-11, 1998

ASHFORD, R.W.; BETTINI, S. Ecology and Epidemiology: Old World. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.) **The Leishmaniasis in Biology and Medicine Biology and Epidemiology**. London: Academic Press, 1987. v.1, p. 366-414.

BADARÓ, R.; DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI R, FOCACCIA R. (Eds.) **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. p. 1234-59.

BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; BOMFIM, G.; CORREIA, D.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Lymphadenopathy as the First Sign of Human Cutaneous Infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **53**:256-9, 1995a.

BARRAL, A.; COSTA, J.M.L.; BITTENCOURT, A.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Polar and Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Brazil: Clinical and Immunopathological Aspects. **Int. J. Dermatol.**, **34**:474-9, 1995b.

BARRAL-NETTO, M.; REED, S.G.; SADIGURSKY, M; SONNENFELD, G. Specific Immunization of Mice Against *Leishmania mexicana amazonensis* Using Solubilized Promastigotes. **Clin. Exp. Immunol.**, **67**:11-9, 1987.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A.W.; ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming Growth Factor- β in Leishmanial Infection: A Parasite Escape Mechanism. **Science**, **257**:545-8, 1992.

BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E.M; BARRAL, A. Human_Leishmaniasis@cytokine.bahia.br. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31**:149-55, 1998.

BARTHOLOME, E.J.; WILLEMS, F.; CRUSIAUX, A.; THIELEMANS, K.; SCHANDENE, L.; GOLDMAN, M. IFN-beta Interferes with the Differentiation of Dendritic Cells from Peripheral Blood Mononuclear Cells: Selective Inhibition of CD40-dependent Interleukin Secretion. **J. Interf. Cytok. Res.**, **19**:471-8, 1999.

BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D.L. Development of a Natural Model of Cutaneous Leishmaniasis: Powerful Effects of Vector Saliva Preexposure on the Long-term Outcome of *Leishmania major* Infection in the Mouse Ear Dermis. **J. Exp. Med.**, **188**:1941-53, 1998.

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D.S.; VAN DER MEIDE, P.H.; SLAYTER, M.V.; NACY, C.A. Administration of Monoclonal Anti-IFN- γ Antibodies In Vivo Abrogates Resistance of C3H/HeN Mice to Infection with *L major*. **J. Immunol.**, **143**:266-74, 1989.

BOGDAN, C.; PAIK, J.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Contrasting Mechanisms for Suppression of Macrophage Cytokine Release by Transforming Growth Factor-beta and Interleukin-10. **J. Biol. Chem.**, **267**:23301-8, 1992.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The Immune Response to *Leishmania*: Mechanisms of Parasite Control and Evasion. **Int. J. Parasitol.**, **28**:121-34, 1998.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The Role of Nitric Oxide in Innate Immunity. **Immunol. Rev.**, **173**:17-26, 2000.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage Deactivation by IL-10. **J. Exp. Med.**, **174**:1549-60, 1991.

BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of Cytokine Patterns Related to Therapeutic Response in Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, **84**:188-94, 1996.

BOTREL, R.L.A.; DUTRA, W.O.; MARTINS, F.A.; GONTIJO, B.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; ALMEIDA, R.P.; MAYRINK, W.; LOCKLEY, R.; GOLLOB, K.J. Flow Cytometric Determination of Cellular Sources and Frequencies of Key Cytokine-Producing Lymphocytes Directed against Recombinant LACK and Soluble *Leishmania* Antigen in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **69**:3232-39, 2001.

BOYTIM, M.L.; LILLY, P.; DROUVALAKIS, K.; LYU, S.C.; JUNG, R.; KRENSKY, A.M.; CLAYBERGER, C. A Human Class II MHC-derived Peptide Antagonizes Phosphatidylinositol 3-kinase to Block IL-2 Signaling. **J. Clin. Invest.**, **105**:1447-53, 2000.

BRANDT, E.; WOERLY, G.; YOUNES, A.B.; LOISEAU, S.; CAPRON, M. IL-4 Production by Human Polymorphonuclear Neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, **68**:125-30, 2000.

BRODSKYN, 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.

BRODSKYN, C.; BEVERLY, S.M.; TITUS, R.G. Virulent or Avirulent (*dhfr-ts*⁻) *Leishmania major* Elicit Predominantly a Type-1 Cytokine by Human Cells In Vitro. **Clin. Exp. Immunol.**, **119**:299-304, 2000.

BRODSKYN, C.I.; DEKREY, G.K.; TITUS, R.G. Influence of Costimulatory Molecules on Immune Response to *Leishmania major* by Human Cells in vitro. **Infect. Immun.**, **69**:665-72, 2001.

BROSSART, P.; ZOBYWALSKI, A.; GRUNEBACH, F.; BEHNKE, L.; STUHLER, G.; REICHARDT, V.L.; KANZ, L., BRUGGER, W. Tumor Necrosis Factor alpha and CD40 Ligand Antagonize the Inhibitory Effects of Interleukin 10 on T-cell Stimulatory Capacity of Dendritic Cells. **Cancer Res**, **60**:4485-92, 2000.

- BRYCESON, A.D.M. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Ethiopia. I. Clinical and Histological Features of the Disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **63**:708-37, 1969.
- BRYCESON, A.D.M. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Ethiopia. II. Immunological Studies. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **64**:380-37, 1970.
- CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and Immunopathological Aspects of Disseminated Cutaneous Leishmaniasis. **Acta Trop.**, **56**:315-25, 1994
- CARVALHO, E.M.; CORREIA FILHO, D.; BACELLAR, O.; LESSA, H.; ROCHA, H. A. Characterization of the Immune Response in Subjects with Self Healing Cutaneous Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **53**:273-7, 1995.
- CASTÉS, M.; TAPIA, F.J. Immunopatologia de la Leishmaniasis Tegumentaria America. **Acta Cient Venezol**, **49**:42-56, 1998.
- CHAN, M.M. T cell Response in Murine *Leishmania mexicana amazonensis* Infection: Production of Interferon-gamma by CD8+ Cells. **Eur. J. Immunol.**, **23**:1181-4, 1993.
- CONCEIÇÃO-DA-SILVA, F.; OLIVEIRA NETO, M.P.; MODLIN, R.; TSCHOPP, J.; PIRMEZ, C. Is Necrosis/Apoptosis Correlated with Evolution of Cutaneous Lesions in the american Tegumentary Leishmaniasis? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**:258-9, 1998.
- CONCEIÇÃO-DA-SILVA, F.; HAHNE, M.; SCHRÖTER, M.; LOUIS, J.Á.; TSCHOPP, J. The Resolution of Lesions Induced by *Leishmania major* in Mice Requires a Functional Fas (APO-1, CD95) Pathway of Citotoxicity. **Eur. J. Immunol.**, **28**:237-45, 1998.
- COUTINHO, S.G.; OLIVEIRA, M.P.; DA-CRUZ, A.M.; DE LUCA, P.M.; MENDONÇA, S.C.F.; BERTHO, A.L.; SOONG, L.; McMAHON-PRATT, D. T-Cell Responsiveness of American Cutaneous Leishmaniasis Patients to Purified *Leishmania pifanoi* Amastigotes Antigens and *Leishmania braziliensis* Promastigotes Antigens: Immunologic Patterns associated with Cure. **Exp. Parasitol.**, **84**:144-55, 1996.

COSTA, J.M.L.; MARSDEN, P.D.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; NETTO, E.M.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; ROSA, A.C.; CUBA, C.C.; MAGALHÃES, A.V.; BARRETO, A.C. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in a Field Clinic in Bahia, Brazil: a Report of Eight Cases. **J. Trop. Méd. Hyg.**, **89**:319-23, 1986.

COSTA, J.M.; VALE, K.C.; FRANCA, F.; SALDANHA, A.C.; DA SILVA, J.O.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D.; MAGALHAES, A.V.; E SILVA CM, SERRA NETO. Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *leishmania viannia braziliensis* in cutaneous lesions. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **23**:205-8, 1990.

COSTA, J.M.; SALDANHA, A.C.; SILVA, C.M.; BRANCO, M.D.; BARRAL, A.; CARVALHO, E.M.; BITTENCOURT, A.L. Spontaneous regional healing of extensive skin lesions in diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **28**:45-7, 1995.

CONVIT, J.; VEGAS, F.K. Disseminated cutaneous leishmaniasis. inoculation to laboratory animals, electron microscopy and fluorescent antibodies studies. **Arch. Dermatol.**, **91**:439-47, 1965.

CUMBERBATCH, M.; DEARMAN, R.J.; ANTONOPOULOS, C.; GROVES, R.W.; KIMBER, I. Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor-alpha- and IL-1beta-dependent mechanism. **Immunology**, **102**:323-30, 2001.

DA-CRUZ, A.M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; BERTHO, A.L.; COUTINHO, S.G. *Leishmania*-reactive cd4⁺ and cd8⁺ t cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **62**:2614-8, 1994.

DA-CRUZ, A.M.; DE OLIVEIRA, M.P.; DE LUCA, P.M.; MENDONÇA, S.C.F.; COUTINHO, S.G. Tumor necrosis factor- α in human american tegumentary leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **91**:225-9, 1996.

DA SILVA, R.P.; HALL, B.F.; JOINER, K.A.; SACKS, D.L. CR1, the C3b Receptor, mediates binding of infective *leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. **J. Immunol.**, **143**:617-22, 1989.

DAVID, J.R.; WANG, B. Mice lacking nk cell developed an efficient th1 response and control cutaneous *leishmania major* infection. **J. Immunol**, **162**:6747-54, 1999.

DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; DONHAUSER, N.; LORENZ, E.; LASKAY, T.; MACMICKING, J.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. Type 1 interferon (ifn α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan. **Parasite Immun.**, **8**:77-82, 1998.

DING, L.; LINSLEY, P.S.; HUANG, L.Y.; GERMAIN, R.N.; SHEVACH, E.M. IL-10 Inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of b7 expression. **J. Immunol.**, **151**:1224-34, 1993.

DOHERTY, T.M.; COFFMAN, R.L. *Leishmania major*: effect of infectious dose on t cell subset development in balb/c mice. **Exp. Parasitol.**, **84**:124-35, 1996.

EBERL, G.; MACDONALD, H.R. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. **Eur. J. Immunol.**, **30**:985-92, 2000.

ENGERS, H.D.; BERGQUIST, R.; MODABBER, F. Progress on vaccines against parasites. **Dev. Biol. Stand.**, **87**:73-84, 1996.

EVANS, T.G.; TEIXEIRA, M.J.; MCAULIFFE, I.T.; VASCONCELOS, I.; VASCONCELOS, A.W.; SOUSA, A.Q.; LIMA, J.W.O.; PEARSON, R.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J. Infect. Dis.**, **166**:1124-32, 1992.

FEHNIGER, T.A.; SHAH, M.H.; TURNER, M.J.; VANDEUSEN, J.B.; WHITMAN, S.P.; COOPER, M.A.; SUZUKI, K.; WECHSER, M.; GOODSID, F.; CALIGIURI, M.A. Differential cytokine and chemokine gene expression by human nk cells following activation with il-18 or il-15 in combination with il-12: implications for the innate immune response. **J. Immunol.**, **162**:4511-20, 1999.

FIAVEY, N.P.; FRANKENBURG, S. Appraisal of the total blood lymphocyte proliferation assay as a diagnostic tool in screening for tuberculosis. **J. Med. Microbiol.**, **37**:283-5, 1992.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse t helper cell. iv. th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by th1 clones. (1989). in: kemp m. – regulator and effector functions of t-cell subsets in human *leishmania* infections. **APMIS**, **68**(Suppl):1-33, 1997.

. D.F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; MOORE, K.W.; O'GARRA, A. IL-10 Acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by th1 cells. : KEMP, M. Regulator and effector functions of t-cell subsets in human *leishmania* infections. **APMIS**, **68**(Suppl):1-33, 1997.

FLESCHE, I.E.; WANDERSEE, A.; KAUFMANN, S.H. IL-4 Secretion by CD4+ NK1+ T cells induces monocyte chemoattractant protein-1 in early listeriosis. **J. Immunol.**, **159**:7-10, 1997.

GAAFAR, A.; KHARAZMI, A.; ISMAIL, A.; KEMP, M.; HEY, A.; CHRISTENSEN, C.B.; DAFALLA, M.; EL KADORA, A.Y.; EL HASSAN, A.M.; THEANDER, T.G. Dichotomy of the T cell response to *leishmania* antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis: absence or scarcity of th1 activity is associated with severe infections. **Clin. Exp. Immunol.**, **100**:239-45, 1995.

GAAFAR, A.; VERESS, B.; PERMIN, H.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T.G.; EL HASSAN, A.M. Characterization of the local and systemic immune response in patients with cutaneous leishmaniasis due to *leishmania major*. **Clin. Immunol.**, **91**:314-20, 1999.

GENARO, O.; DE TOLEDO, V.P.; DA COSTA, C.A.; HERMETO, M.V.; AFONSO, L.C.; MAYRINK, W. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. **Clin. Dermatol.**, **14**:503-12, 1996.

GILLESPIE, R.D.; MBOW, M.L.; TITUS, R.G. The Immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunol.**, **22**:319-31, 2000.

GOMES, L.S. A Intradermo-reação de Montenegro na Leishmaniose e outras Pesquisas afins. **Brasil-Med.**, **53**:1079-81, 1939. In: PESSÔA, S.B.; BARRETO, M.P. (Eds.). **Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Educação e Saúde, 1944. 465p.

GOMES, N.A.; BARRETO-DE-SOUZA, V.; DOS REIS, G.A. Early in vitro priming of distinct T(h) cell subsets determines polarized growth of visceralizing *Leishmania* in macrophages. **Int. Immunol.**, **12**:1227-33, 2000.

GONZALEZ, C.R.; NORIEGA, F.R.; HUERTA, S.; SANTIAGO, A.; VEGA, M.; PANIAGUA, J.; ORTIZ-NAVARRETE, V.; ISIBASI, A.; LEVINE, M.M. Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*. **Vaccine**, **16**:1043-52, 1998.

GREEN, S.J.; CRAWFORDD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the l-argininc-dependent killing mechanism in IFN-gamma stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol**, **145**:4290-7, 1990.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, **6**:230-50, 1993.

GUERRA, M.O.P.; FURTADO, T.; BARROS, G.C.; SESSA, P.A.; DAHER, V.R. Infecção subclínica na leishmaniose tegumentar americana. **An. Brás. Dermatol.**, **60**:365-9, 1985.

HANDMAN, E.; SYMONS, F.M.; BALDWIN, T.M.; CURTIS, J.M.; SCHEERLINCK, J.P. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. **Infect. Immun.**, **63**:4261-7, 1995.

HARTY, J.T.; TVINNEREIM, A.R.; WHITE, D. CD8+ T Cell effector mechanisms in resistance to infection. **Annu. Rev. Immunol.**, **18**:275-308, 2000.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; COFFMAN, R.L.; LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon-gamma or il-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, **169**:59-72, 1989.

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**:730-9, 1995.

HERWALDT, B.L.; ARANA, B.A.; NAVIN, T.R. The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **J. Infect. Dis.**, **165**:518-27, 1992.

HIMMELRICH, H.; LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOUIS, J.A. Some of the early events underlying th2 cell maturation and susceptibility to *leishmania major* infection in BALB/c Mice. **Biol. Chem.**, **380**:909-14, 1999.

HUANG, Y.M.; HUSSIEN, Y.; YARILIN, D.; XIAO, B.G.; LIU, Y.J.; LINK, H. Interferon-beta induces the development of type 2 dendritic cells. **Cytokine**, **13**:264-71, 2001.

HUANG, F.-P.; XU, D.; ESFANDIARI, E.-O.; SANDS, W.; WEI, X.; LIEW, F.Y. Mice defective in fas are highly susceptible to *leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong th1 responses, and enhanced nitric oxide production. **J. Immunol.**, **160**:4143-7, 1998.

HUBER, M.; TIMMS, E.; MAK, T.W.; ROLLINGHOF, M.; LOHOFF, M. Effective and long-lasting immunity against the parasite *leishmania major* in CD8-deficient mice. **Infect. Immun.**, **66**:3968-70, 1998.

HUNTER, C.A.; CHIZZONITE, R.; REMINGTON, J.S. IL-1 β is Required for IL-12 to induce production of IFN- γ by NK cells. **J. Immunol.**, **155**:4347-54, 1995.

ISAZA, D.; RESTREPO, M.; RESTREPO, R.; CACERES-DITTIMAR, G.; TAPIA, F.J. Immunocytochemical and histopathological characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania panamensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**:365-9, 1996.

JANEWAY, C.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J.D. Host Defense against Infection. In: JANEWAY, C.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J.D. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. 4 nd. London: Elsevier Science Ltd / Garland Publishing, 1999. p. 363-415.

JIANG, H.; DHIB-JALBUT, S. Differential induction of IL-12 by IFN-beta and IFN-gamma in human macrophages. **J. Interf. Cytok. Res.**, **18**:697-703, 1998.

JOSEPH, S.B.; MINER, K.T.; CROFT, M. Augmentation of naive, Th1 and Th2 effector CD4 responses by IL-6, IL-1 and TNF. **Eur. J. Immunol.**, **28**:277-289, 1998.

JOSS, A.; AKDIS, M.; FAITH, A.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. IL-10 Directly acts on T cells by specifically altering the CD28 Co-stimulation pathway. **Eur. J. Immunol.**, **30**:1683-90, 2000.

KANALY, S.T.; NASHLEANAS, M.; HONDOWICZ, B.; SCOTT, P. TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens. **J. Immunol.**, **163**:3883-9, 1999.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The Role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J. Immunol.**, **166**:1141-7, 2000.

KEMP, M.; HANSEN, M.B.; THEANDER, T.G. Recognition of leishmania antigens by t lymphocytes from nonexposed individuals. **Infect. Immun.**, **60**:2246-51, 1992.

KEMP, M.; HEY, A.S.; KURTZHALS, J.A.L.; CHRISTENSEN, C.B.V.; GAAFAR, A.; MUSTAFA, M.D.; KORDOFANI, A.A.Y.; ISMAIL, A. KHARAZMI, A.; THEANDER, T.G. Dichotomy of the human t cell response to *leishmania* antigens. i. th1-like response to *leishmania major* promastigotes antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, **96**:410-15, 1994.

KEMP, M. Regulator and effector functions of t-cell subsets in human *leishmania* infections. **APMIS**, **65**(Suppl 68):5-33, 1997.

KEMP, K.; THEANDER, T.G.; HVIID, L.; GAAFAR, A.; KHARAZMI, A.; KEMP, M. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α -producing cells in human who are immune to cutaneous leishmaniasis. **Scand. J. Immunol.**, **49**:655-9, 1999a.

KEMP, K.; KEMP, M.; KHARAZMI, A.; ISMAIL, A.; KURTZHALS, J.A.L.; HVIID, L.; THEANDER, T.G. *Leishmania*-specific T Cells expressing interferon-gamma (IFN- γ) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, **116**:500-504, 1999b.

KONECNY, P.; STAGG, A.J.; JEBBARI, H.; ENGLISH, N.; DAVIDSON, R.N.; KNIGHT, S.C. Murine dendritic cells internalize *leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary t cell proliferation in vitro. **Eur. J. Immunol.**, **29**:1803-11, 1999.

KOUFMAN, K.; EGOZ, N.; GREENBLATT, C.L.; HANDMAN, E.; MONTILIO, B.; EVEN-PAZ, Z. Observations on immunization against cutaneous leishmaniasis. **Isr. J. Med. Sci.**, **14**:218-22, 1978.

KREMER, I.B.; GOULD, M.P.; COOPER, K.D.; HEINZEL, F.P. Pretreatment with recombinant Flt3 Ligand partially protects against progressive cutaneous leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. **Infect. Immun.**, **69**:673-80, 2001.

KURTZHALS, J.A.L.; KEMP, M.; POULSEN, L.K.; HANSEN, M.B.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T.G. Interleukin-4 and interferon-gamma production by *leishmania* stimulated peripheral blood mononuclear cells from nonexposed individuals. **Scand. J. Immunol.**, **41**:343-9, 1995.

KUNIYASU, Y.; TAKAHASHI, T.; ITOH, M.; SHIMIZU, J.; TODA, G.; SAKAGUCHI, S. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. **Int. Immunol.**, **12**:1145-55, 2000.

LASKAY, T.; DIEFENBACH, A.; ROLLINGHOFF, M.; SSOLBACH, W. Early parasite containment is decisive for resistance to *leishmania major* infection. **Eur. J. Immunol.**, **25**:2220-7, 1995.

LAUWERYS, B.R.; GAROT, N.; RENAULD, J.C.; HOUSSIAU, F.A. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. **J. Immunol.**, **165**:1847-53, 2000.

LEIBY, D.A.; SCHREIBER, R.D.; NACY, C.A. IFN-gamma produced in vivo during the first two days is critical for resolution of murine *leishmania major* infections. **Microb. Pathog.**, **14**:495-500, 1993.

LERTMEMONGKOLCHAI, G.; CAI, G.; HUNTER, C.A.; BANCROFT, G.J. Bystander activation of CD8⁺ T cells contributes to the rapid production of IFN-gamma in response to bacterial pathogens. **J. Immunol.**, **166**:1097-105, 2001.

LEWIS, D.J.; WARD, R.D. Transmission and vectors. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK (Eds.). **the leishmaniasis in biology and medicine. biology and epidemiology**. London: Academic Press, 1987. v.I, p. 235-61.

LIEW, F.Y.; LI, Y.; MILLOT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, **145**:4306-10, 1990 a.

LIEW, F.Y.; MILLOT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R.M.J.; MENDONÇA, S. Macrophage killing of *leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J. Immunol.**, **144**:4794-7, 1990 b.

LIMA, G.M.; VALLOCHI, A.L.; SILVA, U.R.; BEVILACQUA, E.M.; KIFFER, M.M.; ABRAHAMSOHN, I.A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. **Immunol. Letter**, **64**:145-51, 1998.

LOCKLEY, R.M.; SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. **Immunoparasitol. Today**, **1**:A58-61, 1991.

MAASHO, K.; SANCHEZ, F.; SCHURR, E.; HAILU, A.; AKUFFO, H. Indications of the Protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. **Infect. Immun.**, **66**:2698-2704, 1998.

MACPHEE, M.J.; GORDON, J.; CHRISTOU, N.V.; SANCHEZ-CANTU, L.; RODE, H.H. Cells recovered from human DTH reactions: phenotypic and functional analysis. **Cell. Immunol.**, **151**:80-96, 1993.

MAROVICH, M.A.; MCDOWELL, M.A.; THOMAS, E.K.; NUTMAN, T.B. IL-12p70 production by *leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. **J. Immunol.**, **164**:5858-65, 2000.

MARSDEN, P.D.; TADA, M.S.; BARRETO, A.C.; CUBA, C.C. Spontaneous healing of leishmania braziliensis skin ulcers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **78**:561-2, 1984.

MARSDEN, P. Mucosal leishmaniasis ("Espundia" Escomel, 1911). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **80**:859-75, 1986.

MARZINOWSKI, E. I. L'Immunité dans le bouton d'Orient. 1928. In: PESSÔA, S.B.; BARRETO, M.P. (Eds.). **Leishmaniose tegumentar americana**. Ministério da Educação e Saúde, 1944. p.464-8.

MARZOCHI, K.B.; MARZOCHI, M.A.; SILVA, A.F.; GRATIVOL, N.; DUARTE, R.; CONFORT, E.M.; MODABBER, F. Phase 1 study of an inactivated vaccine against american tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**:205-12, 1998.

MAUEL, J.; CORRADIN, S.B.; BUCHMULLER ROUILLER, Y. Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of leishmania by activated murine macrophages. **Res. Immunol.**, **142**:577-80, 1991.

MAYRINK, W.; COSTA, C.A.; MAGALHÃES, P.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; OLIVEIRA LIMA, A.; MICHALICK, M.S.; WILLIAM, P. A Field trial of a vaccine against american dermal leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, **73**:385-7, 1979.

MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; DA COSTA, C.A.; MAGALHAES, P.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; OLIVEIRA LIMA, A.; MICHALICK, M.S.; FERREIRA CARVALHO, E.; BARROS, G.C.; SESSA, P.A.; ALENCAR, J.T.A. An experimental vaccine against american dermal leishmaniasis: experience in the state of Espirito Santo, Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **79**:259-69, 1985.

MAYRINK, W.; ANTUNES, C.M.; DA COSTA, C.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.; MAGALHAES, P.A.; DE OLIVEIRA LIMA, A.; WILLIAMS, P. Futher trials of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **80**:1001-6, 1986.

MBOW, M.L.; BLEYENBERG, J.A.; HALL, L.R.; TITUS, R.G. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2 response in mice infected with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, **161**:5571-7, 1998.

MCRAE, B.L.; NAGAI, T.; SEMNANI, R.T.; VAN SEVENTER, J.M.; VAN SEVENTER, G.A. Interferon-alpha and -beta inhibit the in vitro differentiation of immunocompetent human dendritic cells from CD14(+) precursors. **Blood**, **96**:210-7, 2000.

MELBY, P.C.; OGDEN, G.B.; FLORES, H.A.; ZHAO, W.; GELDMACHER, C.; BIEDIGER, N.M.; AHUJA, S.K.; URANGA, J.; MELENDEZ, M. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a CDNA expression library. **Infect. Immun.**, **68**:5595-602, 2000.

MENDONÇA, S.C.; DE LUCA, P.M.; MAYRINK, W.; RESTOM, T.G.; CONCEICAO-SILVA, F.; DA-CRUZ, A.M.; BERTHO, A.L.; DA COSTA, C.A.; GENARO, O.; TOLEDO, V.P.; COUTINHO, S.G. Characterization of human t lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against american tegumentary leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **53**:195-201, 1995.

MENON, J.N.; BRETSCHER, P.A. Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to *leishmania major* following exposure to low doses of *l. major* and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. **Eur. J. Immunol.**, **26**:243-9, 1996.

MENON, J.N.; BRETSCHER, P.A. Parasite dose determines the Th1/Th2 nature of the response to *leishmania major* independently of infection route and strain of host or parasite. **Eur. J. Immunol.**, **28**:4020-8, 1998.

Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Inf. Epidemiol. SUS**, **4**:85, 1998.

MODLIN, R.L.; TAPIA, F.J.; BLOOM, B.R.; GALLINOTO, M.E.; CASTÉS, M.; RONDON, A.J.; REA, T.H.; CONVIT, J. In situ characterization of the cellular immune response in american cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, **60**:241-8, 1985.

MOLL, H.; FUCHS, H.; BLANK, C.; ROLLINGHOFF, M. Langerhans cells transport *leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **Eur. J. Immunol.**, **23**:1595-601, 1993.

MOLYNEUX, D.H.; KILLICK-KENDRICK, R. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.). **The Leishmaniasis in biology and medicine, biology and epidemiology**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 122-8.

MORRIS, L.; TROUTT, A.B.; HANDMAN, E.; KELSO, A. Changes in the precursor frequencies of IL-4 and IFN- γ secreting CD4⁺ cells correlate with resolution of lesions in murine cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, **8**:2715-21, 1992.

MOUGNEAU, E.; ALTARE, F.; WAKIL, A.E.; ZHENG, S.; COPPOLA, T.; WANG, Z.E.; WALDMANN, R.; LOCKSLEY, R.M.; GLAICHENHAUS, N. Expression cloning of a protective *leishmania* antigen. **Science**, **268**:563-6, 1995.

MUKHOPADHYAY, S.; SEM., P.; BHATTACHARYA, S.; MAJUMDAR, S.; ROY, S. Immunoprophylaxis and immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccine**, **17**:291-300, 1999.

MULLER, I.; PEDRAZZINI, T.; KROPF, P.; LOUIS, J.; MILON, G. Establishment of resistance to *leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells. **Int. Immunol.**, **3**:587-97, 1991.

MULLER, I. Role of T cell subsets during the recall of immunologic memory to *leishmania major*. **Eur. J. Immunol.**, **22**:3063-9, 1992.

MULLER, I.; KROPF, P.; ETGES, R.J.; LOUIS, J.A. Gamma interferon response in secondary *leishmania major* infection: role of CD8⁺ T cells. **Infect. Immun.**, **61**:3730-8, 1993.

MULLER, I.; KROPF, P.; LOUIS, J.Á.; MILON, G. Expansion of gamma interferon-producing CD8⁺ T cells following secondary infection of mice immune to *leishmania major*. **Infect. Immun.**, **62**:2575-81, 1994.

MURRAY, H.W.; RUBIN, B.Y.; ROTHERMEL, C.D. Killing of intracellular *leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. **J. Clin. Invest.**, **72**:1506-10, 1983.

NAKAMURA, T.; KAMOGAWA, Y.; BOTTOMLY, K.; FLAVELL, R.A. Polarization of IL-4 and IFN- γ -producing CD4⁺ T cells following activation of naive CD4⁺ T Cells. **J. Immunol.**, **158**:1085-94, 1997.

NASCIMENTO, E.; MAYRINK, W.; DA COSTA, C.A.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N.; BARROS, G.C.; DIAS, M.; ANTUNES, C.M.; LIMA, M.S.; TABOADA, D.C.; LIU, T.Y. Vaccination of humans against cutaneous leishmaniasis: cellular and humoral immune responses. **Infect. Immun.**, **58**:2198-203, 1990.

- NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W.; WIEBE, M.E.; RUBIN, B.Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, **158**:670-89, 1983.
- NOBEN-TRAUTH, N.; KROPF, P.; MÜLLER, I. Susceptibility to *leishmania major* infection in interleukin-4 deficient mice. **Science**, **271**:987-90, 1996.
- NOBEN-TRAUTH, N.; PAUL, W.E.; SACKS, D. IL-4 and IL-4 receptor-deficient balb/c mice reveal differences in susceptibility to *leishmania major* parasite substrains. **J. Immunol.**, **162**:6132-40, 1999.
- NOBEN-TRAUTH, N.; HU-LI, J.; PAUL, W.E. Conventional, naive CD4+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. **J. Immunol.**, **165**:3620-5, 2000.
- OPENSHAW, P.; MURPHY, E.E.; HOSKEN, N.A.; MAINO, V.; DAVIS, K.; MURPHY, K.; O'GARRA, A. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. **J. Exp. Med.**, **182**:1357-67, 1995.
- OVERATH, P.; HARBECKE, D. Course of leishmania infection in beta 2-microglobulin-deficient mice. **Immunol. Lett.**, **37**:13-7, 1993.
- PALUDAN, S.R. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. **J. Immunol.**, **48**:459-68, 1998.
- PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. *Leishmania* species: visceral (Kala-azar), cutaneous and mucosal leishmaniasis. In: MANDELL, G.L.; BENNET, J. DOLIN, R (Eds.). **Principles and practice of infectious diseases**. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 2066-77.
- PEDERSEN, B.K. Special feature for the olympics: effects of exercise on the immune system: exercise and cytokines. **Immunol. Cell Biol.**, **78**:532-5, 2000.

PESSÔA, S.B.; PESTANA, B.R. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germes mortos. **Rev. Biol. Hig.**, 10:112-8, 1940. In: PESSÔA, S.B.; BARRETO, M.P. (Eds.) **Leishmaniose tegumentar americana**. Ministério da Educação e Saúde, 1944. p. 464-8.

PESSÔA, S, B. Profilaxia da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. **Folha Med**, 22:157-61, 1941a. In: PESSÔA, S.B.; BARRETO, M.P. (Eds.). **Leishmaniose tegumentar americana**. Ministério da Educação e Saúde. 1944. p. 464-8.

PESSÔA, S.B. Segunda nota sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com leptomonas mortas. 1941b. In: PESSÔA, S.B.; BARRETO, M.P. (Eds.). **Leishmaniose tegumentar americana**. Ministério da Educação e Saúde, 1944. p. 464-8.

PIEDRAFITA, D.; PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A.V.; XU, D.; SANDS, W.; FENG, G.J.; THOMAS, E.; BREWER, J.; FERGUSON, M.A.; ALEXANDER, J.; LIEW, F.Y. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *leishmania* phosphoglycans. **Eur. J. Immunol.**, 29:235-44, 1999.

PIRMEZ, C.; COOPER, C.; PAES-OLIVEIRA, M.; SCHUBACH, A.; TORIGIAN, V.K.; MODLIN, R.L. Immunologic responsiveness in american cutaneous leishmaniasis lesions. **J. Immunol.**, 145:3100-4, 1990.

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

PLEBANSKI, M.; LEE, E.A.; HANNAN, C.M.; FLANAGAN, K.L.; GILBERT, S.C.; GRAVENOR, M.B.; HILL, A.V. Altered peptide ligands narrow the repertoire of cellular immune responses by interfering with T-cell priming. **Nat. Med.**, 5:565-71, 1999.

POMPEU, M.L.; FREITAS, L.A.R.; SANTOS, M.L.V.; KHOURI, M.; BARRAL-NETTO. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *leishmania amazonensis*. A quantitative approach. **Acta Trop.**, 48:185-93, 1991.

PRESTON, P.M.; DUMONDE, D.C. Experimental cutaneous leishmaniasis. V. protective immunity in subclinical and self-healing infection in the mouse. **Clin. Exp. Immunol.**, **23**:126-38, 1976.

PUENTES, S.M.; DA SILVA, R.P.; SACKS, D.L.; HAMMER, C.H.; JOINER, K.A. Serum resistance of metacyclic stage *leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **J. Immunol.**, **145**:4311-5, 1990.

RACIOPPI, L.; RONCHESE, F.; MATIS, L.A.; GERMAIN, R.N. Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signaling. **J. Exp. Med.**, **177**:1047-60, 1993.

REED, S.G.; BADARO, R.; MASUR, H.; CARVALHO, E.M.; LORENCO, R.; LISBOA, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JUNIOR, W. D.; JONES, T. C. Selection of a skin test antigen for american visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **35**:79-5, 1986.

REINER, S.L.; ZHENG, S.; WANG, Z-E.; STOWRING, L.; LOCKSLEY, R.M. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. **J. Exp. Med.**, **179**:447-56, 1994.

REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. The Regulation of immunity to *leishmania major*. **Annu. Rev. Immunol.**, **13**:151-77, 1995.

RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents Dis.**, **4**:143-52, 1995.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, A.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31**:143-8, 1998.

ROCHA, P.N.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; RIBEIRO-DE-JESUS, A.; CORREIA FILHO, D.; CRUZ FILHO, A.; BARRAL, A.; COFFMAN, R.L.; MARCELINO, E.M. Down-regulation of Th1 type of response in early human american leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **180**:1731-4, 1999.

ROCHA, F.J.S. **Análise histopatológica e imunohistoquímica da linfadenopatia em pacientes com leishmaniose tegumentar americana no Estado do Ceará, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Patologia). 1998. Universidade Federal do Ceará, Departamento de Patologia e Medicina Legal. Fortaleza.

ROWE, J.A.; SCRAGG, I.G.; KWIATKOWSKI, D.; FERGUSON, D.J.; CARUCCI, D.J.; NEWBOLD, C.I. Implications of mycoplasma contamination in Plasmodium falciparum cultures and methods for its detection and eradication. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **92**:177-80, 1998.

RUSSO, D.M.; CHAKRABARTI, P.; BURNS JUNIOR, J.M. Naive human T cells develop into Th1 or Th0 effectors and exhibit cytotoxicity early after stimulation with *leishmania*-infected macrophages. **J. Infect. Dis.**, **177**:1345-51, 1998.

RUSSO, D.M.; CHAKRABARTI, P.; HIGGINS, A.Y. *Leishmania*: naive human T cells sensitized with promastigotes antigen and IL-12 develop into potent TH1 and CD8⁺ cytotoxic effectors. **Exp. Parasitol.**, **93**:161-70, 1999.

SALAZAR, J. H. Aspectos inmunológicos de la leishmaniasis tegumentaria americana. ensayos profilacticos mediante vacunaciones com formas leptomonas vivas de cultivo de *leishmania brasiliensis vianna*, 1911. **Arq. Venez. Med. Trop. y Parasitol. Med.**, **5**:365-84, 1965.

SARAVIA, N.G.; VALDERRAMA, L.; LABRADA, M.; HOLGUIN, A.F.; NAVAS, C.; PALMA, G.; WEIGLE, K.A. The Relationship of *leishmania brasiliensis* subspecies and immune response to disease expression in new world leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **159**:725-35, 1989.

SATO, N.; AHUJA, S.K.; QUINONES, M.; KOSTECKI, V.; REDDICK, R.L.; MELBY, P.C.; KUZIEL, W.A.; AHUJA, S.S. CC Chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by TH2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. **J. Exp. Med.**, **192**:205-18, 2000.

SATOSKAR, A.R.; STAMM, L.M.; ZHANG, X.; SATOSKAR, A.A.; OKANO, M.; TERHORST, C.; DAVID, J.R.; WANG, B. Mice lacking NK cells develop an efficient TH1 response and control cutaneous *leishmania major* infection. **J. Immunol.**, **162**:6747-54, 1999.

SCHARTON, T.M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon-gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subset and induces early resistance to *leishmania major* in mice. **J. Exp. Med.**, **178**:567-77, 1993.

SCHARTON-KERSTEN, T.; SCOTT, P. The Role of the innate immune response in TH1 cell development following *leishmania major* infection. **J. Leukoc. Biol.**, **57**:515-22, 1995.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R.L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exarcebation belong to different t helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J. Exp. Med.**, **168**:1675-84, 1988.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.W.; COFFMAN, R.L.; SHER, A. Role of cytokines and CD4⁺ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunol. Rev.**, **112**:161-82, 1989.

SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of TH1 and TH2 response in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, **147**:3149-55, 1991.

SCOTT, P. Differentiation, regulation, and death of T helper cell subsets during infection with *leishmania major*. **Immunol. Res.**, **17**:229-38, 1998.

SCOTT, P.; KAUFMANN, S.H.E. The role of T-Cell subsets and cytokines in the regulation of infection. **Immunol Today**, **12**:346-8, 1991.

SCOTT, P.; EATON, A.; GAUSE, W.C.; ZHOU, X.D.; HONDOWICZ, B. Early IL-4 production does not predict susceptibility to *leishmania major*. **Exp. Parasitol.**, **84**:178-87, 1996.

SHANKAR, A.H.; TITUS, R.G. *Leishmania major*-specific, CD4+, major histocompatibility complex class II-restricted T cells derived in vitro from lymphoid tissues of naive mice. **J. Exp. Med.**, **178**:101-11, 1993.

SHANKAR, A.H.; TITUS, R.G. The Influence of antigen-presenting cell type and interferon-gamma on priming and cytokine secretion of *leishmania major*-specific T cells. **J. Infect. Dis.**, **175**:151-7, 1997.

SHER, A.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; GAZZINELLI, R.T. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN- γ response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor- α . **J. Immunol.**, **150**:3982-89, 1993.

SLOAN-LANCASTER, J.; SHAW, A.S.; ROTHBARD, J.B.; ALLEN, P.M. Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of Zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. **Cell**, **79**:913-922, 1994.

SILVA, D.B. Leishmaniose anérgica hansenóide. **An. Brás. Dermatol.**, **57**:147-50, 1982.

SILVA, T.M.C. **A resposta imuno-inflamatória na leishmaniose tegumentar humana.** 1999. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SJOLANDER, A.; BALDWIN, T.M.; CURTIS, J.M.; BENGTSSON, K.L.; HANDMAN, E. Vaccination with recombinant parasite surface antigen 2 from *leishmania major* induces a TH1 type of immune response but does not protect against infection. **Vaccine**, **16**:2077-84, 1998.

SKEIKY, Y.A.; KENNEDY, M.; KAUFMAN, D.; BORGES, M.M.; GUDERIAN, J.A.; SCHOLLER, J.K.; OVENDALE, P.J.; PICHA, K.S.; MORRISSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.G. LeIF: a recombinant leishmania protein that induces an IL-12-mediated TH1 cytokine profile. **J. Immunol.**, **161**:6171-9, 1998.

SOARES, M.B.; DAVID, J.R.; TITUS, R.G. An in vitro model for infection with *leishmania major* that mimics the immune response in mice. **Infect. Immun.**, **65**:2837-45, 1997.

SOUSA, A.Q.; PARISE, M.E.; POMPEU, M.M.L.; COELHO, J.M.F.; VASCONCELOS, I.A.B.; LIMA, J.W.O.; OLIVEIRA, E.G.; VASCONCELOS, A.W.; DAVID, J.R.; MAGUIRE, J.H. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *leishmania (v.) braziliensis* infection in Ceará, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **53**: 380-385, 1995.

SUTTERWALA, F.S.; MOSSER, D.M. The taming of IL-12: suppressing the production of proinflammatory cytokines. **J. Leukoc. Biol.**, **65**:543-51, 1999.

TAAMS, L.S.; BOOT, E.P.; VAN EDEN, W.; WAUBEN, M.H. "Anergic" T cell modulate the t-cell activating capacity of antigen-presenting cells. **J. Autoimmun.**, **14**:335-41, 2000.

TACCHINI-COTTIER, F.; ZWEIFEL, C.; BELKAID, Y.; MUKANKUNDIYE, C.; VASEI, M.; LAUNOIS, P.; MILON, G.; LOUIS, J.Á. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *leishmania major*. **J. Immunol.**, **165**:2628-36, 2000.

TAKAYAMA, K.; YOKOZEKI, H.; GHOREISHI, M.; SATOH, T.; KATAYAMA, I.; UMEDA, T.; NISHIKA, K. IL-4 Inhibits the migration of human langerhans cells through the downregulation of TNF receptor II expression. **J. Invest. Dermatol.**, **113**:541-6, 1999.

TAYLOR, A.P.; MURRAY, H.W. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon- γ : effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon- γ gene-disrupted mice. **J. Exp. Med.**, **185**:1231-9, 1997.

THEODOS, C.M.; POVINELLI, L.; MOLINA, R.; SHERRY, B.; TITUS, R.G. Role of tumor necrosis factor in macrophages leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. **Infect. Immun.**, **59**:2839-42, 1991.

THOMSON, J.G. The question of immunity in man to protozoal diseases. 1931. In: PESSÔA, S.B.; BARRETO, M.P. (Eds.). **Leishmaniose tegumentar americana**. Ministério da Educação e Saúde, 1944. p. 464-8.

TITUS, R.G.; GUEIROS-FILHO, F.J.; FREITAS, L.A.R.; BEVERLY, S.M. Development Of A Safe vaccine line by gene replacement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**:10267-71, 1995.

VAN WEYENENBERGH J, SILVA MP, BAFICA A, CARDOSO S, WIETZERBIN J, BARRAL-NETTO M. - IFN-beta and TGF-beta differentially regulate IL-12 Activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Letter*, **75**(2):117-22, 2001.

VENDETTI, S.; CHAI, J.G.; DYSON, J.; SIMPSON, E.; LOMBARDI, G.; LECHLER, R. Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. **J. Immunol.**, **165**:1175-81, 2000.

VERAS, P.; BRODSKYN, C.I.; BALESTIERI, F.M.; FREITAS, L.A.R.; RAMOS, A.P.S.; QUEIROZ, A.R.P.; BEVERLY, S.M.; BARRAL-NETTO, M. Dhfr-ts⁻ *Leishmania major* knockout mutant cross protects against *leishmania amazonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**:491-6, 1999.

VIEIRA, L.Q.; GOLDSCHMIDT, M.; NASHLEANAS, M.; PFEFFER, K.; MAK, T.; SCOTT, P. Mice lacking the TNF- α receptor P55 fail to resolve lesions caused by infection with *leishmania major*, but control parasite replication. **J. Immunol.**, **157**:408-11, 1996.

VON DER WEID, T.; BEEBE, A.M.; ROOPENIAN, D.C.; COFFMAN, R.L. Early Production of IL-4 and induction of Th2 response in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4⁺ NK1.1⁻ T cell population. **J. Immunol.**, **157**:4421-7, 1996.

VON STEBUT, E.; BELKAID, Y.; JAKOB, T.; SACKS, D.L.; UDEY, M.C. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*leishmania* immunity. **J. Exp. Med.**, **188**:1547-52, 1998.

WALTON, B.C. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.). **Clinical aspects and control. The Leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic, 1987. v.2, 637p.

WAGNER, H.M.; BEUSCHER, H.U.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Interferon-gamma inhibits the efficacy of interleukin 1 to generate a Th2-cell biased immune response induced by *leishmania major*. **Immunobiology**, **182**:292-306, 1991.

WANG, B.; AMERIO, P.; SAUDER, D.N. Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration. **J. Leukoc. Biol.**, **66**:33-9, 1999a.

WANG, B.; ZHUANG, L.; FUJISAWA, H.; SHINDER, G.A.; FELICIANI, C.; SHIVJI, G.M.; SUZUKI, H.; AMERIO, P.; TOTO, P.; SAUDER, D.N. Enhanced epidermal langerhans cell migration in IL-10 knockout mice. **J. Immunol.**, **162**:277-83, 1999b.

WARBURG, A.; SCHLEIN, Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of phlebotomus papatasi on the transmission of *leishmania major*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **35**:926-30, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Infectious disease. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisdis1.html>>. Acesso em 25 nov. 2000.

YAP, G.S.; ORTMANN, R.; SHEVACH, E.; SHER, A. A Heritable defect in IL-12 signaling in B10.Q/J mice: II. Effect on acute resistance to *toxoplasma gondii* and rescue by IL-18 treatment (Submetido).

ZAKRAOUI, H.; BEN SALAH, A.; FTAITI, A.; MARRAKCHI, H.; ZAATOUR, A.; ZAAFOURI, B.; AHMADI, Z.; GARRAOUI, A.; BEN OSMAN, A.; DELLAGI, K.
Spontaneous course of lesions of leishmania major cutaneous leishmaniasis in Tunisia.
Ann. Dermatol. Venereol., 122:405-7, 1995.

9 ANEXOS

9.1 TERMO DE COMPROMISSO

Eu _____, fui informado que este estudo é uma pesquisa e que seu objetivo é determinar a relação entre resposta imune e as formas clínicas da leishmaniose. A parte neste estudo prevê a doação de sangue antes e após vacina contra leishmaniose, a que serei submetido. A duração prevista de minha participação na pesquisa é de no máximo 90 dias.

O procedimento será o seguinte: doarei 50 ml de sangue antes e 7 semanas após a vacinação. O desconforto e risco inerentes ao procedimento são aqueles relacionados com a retirada de sangue venoso, como dor local e, mais raramente, infecção podem ocorrer. Este é um procedimento médico de rotina e todos os cuidados serão tomados.

Os resultados deste estudo serão discutidos comigo e considerados confidenciais. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Dr. _____ discutiu comigo esta informação e se colocou a disposição para responder. Se eu tiver novas perguntas poderei contactá-lo pelo telefone _____ ou entrar em contato com o responsável Dr. _____ pelo telefone _____.

Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária e sou livre para me recusar de participar do estudo ou me retirar em qualquer época, sem afetar os cuidados médicos que devo receber. Recebi um cópia deste formulário e tive oportunidade de ler com cuidado.

Pelo presente, consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em mim.

Ass. Voluntário

RG.

Ass. Testemunha

RG

Data: ____/____/____

Anexo 9.2 – Resultado da intradermo-reação de Montenegro e da concentração de IFN γ no sobrenadante de MSP de indivíduos com 40 dias pós-vacinação contra *Leishmania*.

Voluntários	IDRM (mm)	IFNγ (pg/10⁶ cels.)
1	11,5	112,4
2	0,7	19,5
3	11,5	461,6
4	8,3	946,2
5	4,7	3607,2
6	11,0	2496,5
7	10,0	3134,0
8	6,0	1756,0
9	0,0	120,2
10	6,5	1923,0
11	9,5	305,2
12	4,5	21,3
13	5,3	1867,2
14	0,0	1307,6
15	4,0	340,4
16	6,3	87,7
17	8,0	341,2
18	7,5	373,2
19	11,8	28,6
20	5,5	1,0
21	0,0	93,1
22	13,3	187,8
23	9,0	21,0
24	10,8	13,5
25	8,0	77,4
26	8,3	5,0
27	8,0	29,1
28	4,7	18,7
29	10,0	28,2
30	5,0	7,6
31	12,0	4,4
32	7,0	11,7

Anexo 9.3 – Fenótipo ex-vivo observado antes e com 40 dias após vacinação contra leishmaniose. Média \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$.

Sub-populações	Respondedor Rápido		Respondedor Lento	
	Pré-vacina (%)	Pós-vacinação (%)	Pré-vacina (%)	Pós-vacinação (%)
CD4 ⁺	36,5 \pm 9,1	35,0 \pm 13,5	33,2 \pm 8,1	35,4 \pm 11,5
CD8 ⁺	20,7 \pm 5,7	25,8 \pm 6,9 *	18,5 \pm 8,7	22,7 \pm 9,9
CD19 ⁺	20,6 \pm 7,4	14,4 \pm 6,0	21,5 \pm 13,4	14,9 \pm 5,5
CD56 ⁺	13,2 \pm 6,4	10,2 \pm 5,9	14,1 \pm 6,5	13,9 \pm 5,6

Anexo 9.4 – Produção de IFN- γ (pg/10⁶cels.) por CMSP de indivíduos RR ou RL, durante os dois ciclos de sensibilização *in vitro* com promastigotas vivas de *L. amazonensis*.

Respondedor Rápido			Respondedor Lento		
N ^o Voluntário	1 ^a Estimulação	2 ^a Estimulação	N ^o Voluntário	1 ^a Estimulação	2 ^a Estimulação
1	2663,0	4107,0	2	9,5	3,9
5	401,8	1680,0	12	0,7	22,9
6	686,2	3774,0	19	57,1	49,1
7	182,4	586,6	28	1,3	70,3
8	683,8	1681,0	29	34,7	164,3
10	609,4	3895,0	31	19,5	76,6
11	1401,2	3614,0	32	72,7	28,5
14	60,5	337,4	34	41,4	46,6
16	70,7	439,5	35	170,5	27,7
17	17,6	342,6	37	7,5	0,1
21	613,6	2782,5	38	34,4	0,1
23	NR	1003,0	39	1,3	0,1
24	NR	1195,0	41	59,8	0,1
25	NR	835,6	42	22,7	0,1
27	NR	337,5	44	46,4	0,1
30	53,9	974,2	45	43,6	141,8

Anexo 9.5 – Produção de TNF- α (pg/10⁶cels.) por CMSP de indivíduos RR ou RL, durante os dois ciclos de sensibilização in vitro com promastigotas vivas de *L. amazonensis*.

Respondedor Rápido			Respondedor Lento		
Nº	1 ^a	2 ^a	Nº	1 ^a	2 ^a
Voluntário	Estimulação	Estimulação	Voluntário	Estimulação	Estimulação
1	569,6	562,8	2,	262,4	0,0
5	27,3	262,1	12	5,0	0,0
6	644,4	453,1	19	5,1	0,0
7	15,6	87,9	28	10,6	39,3
8	58,9	282,1	29	4,4	33,1
10	64,9	802,6	31	7,7	0,0
11	42,6	0,0	32	7,4	5,9
14	14,0	52,2	34	3,0	1,4
16	7,6	21,7	35	4,5	27,1
17	9,5	10,7	37	13,5	12,0
21	17,8	22,9	38	9,9	1,7
23	NR	108,3	39	5,5	0,0
24	NR	91,7	41	17,5	0,0
25	NR	75,3	42	12,5	22,4
27	NR	20,8	44	3,4	2,0
30	6,1	46,3	45	11,0	33,3

Anexo 9.6 – Produção de IL-10 (pg/10⁶cels.) por CMSP de indivíduos RR ou RL, durante os dois ciclos de sensibilização in vitro com promastigotas vivas de *L. amazonensis*.

Respondedor Rápido			Respondedor Lento		
Nº	1ª	2ª	Nº	1ª	2ª
Voluntário	Estimulação	Estimulação	Voluntário	Estimulação	Estimulação
1	198,0	91,3	2	139,9	20,1
5	108,1	38,4	12	8,0	226,4
6	127,0	39,6	19	37,6	3,1
7	158,8	1,3	28	10,3	38,3
8	118,5	3,7	29	28,9	
10	114,9	2,0	31	10,4	4,3
11	162,8	17,6	32	27,2	60,5
14	18,6	217,6	34	3,7	5,6
16	33,1	338,5	35	47,1	67,1
17	17,0	296,5	37	19,0	5,1
21	28,6	59,3	38	8,9	4,0
23	NR	21,7	39	13,2	2,0
24	NR	38,6	41	30,5	37,3
25	NR	34,2	42	36,0	27,5
27	NR	35,0	44	7,1	194,1
30,	14,3	41,8	45	14,0	13,6

Anexo 9.7 – Produção de IL-5 (pg/10⁶cels.) por CMSP de indivíduos RR ou RL, durante os dois ciclos de sensibilização in vitro com promastigotas vivas de *L. amazonensis*.

Respondedor Rápido			Respondedor Lento		
Nº	1^a	2^a	Nº	1^a	2^a
Voluntário	Estimulação	Estimulação	Voluntário	Estimulação	Estimulação
1	7,7	0,0	2	2,9	0,0
5	2,7	NR	12	0,0	19,8
6	3,1	0,0	19	4,8	8,5
7	0,0	0,0	28	23,9	24,6
8	0,0	0,0	29	7,9	21,5
10	0,0	0,0	31	3,2	107,0
11	1,7	11,9	32	12,6	17,0
14	8,2	76,7	34	15,5	36,5
16	10,6	169,1	35	56,5	42,4
17	1,3	28,1	37	6,7	31,2
21	18,3	171,4	38	8,7	51,6
23,0	NR	534,9	39	1,8	8,3
24,0	NR	39,7	41	19,4	23,0
25,0	NR	251,0	42	10,4	23,3
27,0	NR	42,4	44	4,5	19,8
30,0	20,8	110,5	45	1,1	70,8

Anexo 9.8 – Produção de IFN- γ (pg/10⁶cels.) por CMSP, após estimulação com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, em indivíduos RR ou RL, com 40 dias ou 6 meses pós-vacinação contra leishmaniose.

Respondedor Rápido			Respondedor Lento		
Nº Voluntário	40 dias Pós-vacinação	6 meses Pós-vacinação	Nº Voluntário	40 dias Pós-vacinação	6 meses Pós-vacinação
1	112,4	2370,0	2	19,5	3184,0
5	461,6	5116,0	17	21,3	668,4
6	946,2	66,8	24	87,7	949,0
7	3607,2	4182,0	28	28,6	1006,8
8	2496,5	163,6	29	1,0	1681,6
10	3134,0	NR	30	93,1	2300,0
11	1756,0	187,0	32	21,0	1656,6
12	120,2	4342,0	34	13,5	2002,0
14	1923,0	898,0	35	77,4	2123,0
16	305,2	2250,0	37	5,0	2004,0
19	1867,2	2132,0	38	29,1	2298,0
21	1307,6	2126,0	39	18,7	1770,2
23	340,4	409,6	41	28,2	4282,0
25	341,2	NR	42	7,6	127,3
27	373,2	645,6	44	4,4	615,0
31	187,8	4074,0	45	11,7	2720,0

Anexo 9.9 – Produção de TNF- α (pg/10⁶cels.) por CMSP, após estimulação com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, em indivíduos RR ou RL, com 40 dias ou 6 meses pós-vacinação contra leishmaniose.

Respondedor Rápido			Respondedor Lento		
Nº Voluntário	40 dias Pós-vacinação	6 meses Pós-vacinação	Nº Voluntário	40 dias Pós-vacinação	6 meses Pós-vacinação
1	1278,0	199,0	2	134,6	103,0
5	490,0	174,0	17	5,4	11,0
6	886,6	5,4	24	8,8	8,0
7	1017,0	266,0	28	12,7	24,0
8	395,0	15,0	29	4,6	12,9
10	949,6	NR	30	36,5	1,0
11	388,8	9,0	32	6,6	13,0
12	4,2	167,6	34	14,6	5,0
14	7,3	14,0	35	5,0	8,0
16	2,9	16,0	37	5,5	16,0
19	750,8	15,0	38	3,6	NR
21	647,0	22,0	39	3,0	21,8
23	10,6	NR	41	10,7	13,0
25	NR	NR	42	2,8	3,0
27	107,9	6,0	44	0,4	7,54
31	9,9	16,0	45	6,7	14,0

Anexo 9.10 – Produção de IL-10 (pg/10⁶cels.) por CMSP, após estimulação com promastigotas vivas de *L. amazonensis*. em indivíduos RR ou RL, com 40 dias ou 6 meses pós-vacinação contra leishmaniose.

Respondedor Rápido			Respondedor Lento		
Nº Voluntário	40 dias Pós- vacinação	6 meses Pós- vacinação	Nº Voluntário	40 dias Pós- vacinação	6 meses Pós- vacinação
1	203,7	133,6	2	97,5	25,0
5	200,7	90,1	17	26,6	79,9
6	154,5	13,5	24	35,2	102,3
7	93,2	99,5	28	19,2	10,9
8	68,5	30,0	29	NR	41,6
10	0,4	NR	30	32,5	22,9
11	166,7	39,0	32	32,0	17,1
12	32,3	25,7	34	17,4	81,0
14	131,5	15,9	35	79,8	54,4
16	101,3	NR	37	9,4	12,2
19	26,0	5,4	38	7,0	7,6
21	54,5	24,7	39	3,3	5,5
23	37,7	NR	41	39,0	25,5
25	30,6	NR	42	66,7	21,2
27	50,3	4,2	44	46,5	93,2
31	6,1	19,3	45	14,9	4,1

Anexo 9.11 – Produção de IL-5 (pg/10⁶cels.) por CMSP, após estimulação com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, em indivíduos RR ou RL, com 40 dias ou 6 meses pós-vacinação contra leishmaniose.

Respondedor Rápido			Respondedor Lento		
Nº Voluntário	40 dias Pós-vacinação	6 meses Pós-vacinação	Nº Voluntário	40 dias Pós-vacinação	6 meses Pós-vacinação
1	3,5	22,3	2	3,6	15,72
5	4,0	40,52	17	33,2	131,22
6	5,7	66,58	24	44,2	160,6
7	3,4	9,94	28	54,4	228,0
8	4,4	171,26	29	11,9	43,0
10	6,1	NR	30	16,2	32,6
11	3,4	44,9	32	41,7	47,2
12	47,9	92,4	34	78,9	142,3
14	11,3	101,28	35	65,5	74,2
16	16,3	79,76	37	41,0	271,0
19	3,5	84,38	38	21,3	174,3
21	4,1	89,18	39	11,9	118,1
23	82,8	NR	41	50,5	149,2
25	17,6	NR	42	17,5	48,9
27	32,3	56,2	44	11,7	54,7
31	8,6	42,7	45	60,1	80,7

Anexo 9.12 - Quantificação de anticorpos IgG séricos contra antígeno de *L. amazonensis*, por ELISA, em RR ou RL, antes e em dois períodos após vacinação. O ponto de corte foi estabelecido previamente em 0,1.

Respondedor Rápido				Respondedor Lento			
Pré-vacina		Pós-vacinação		Pré-vacina		Pós-vacinação	
Volunt.		40 dias	6 meses	Volunt.		40 dias	6 meses
1	0,030	0,277	0,262	2	0,086	0,128	0,041
5	0,086	0,282	0,169	17	0,054	0,075	0,248
6	0,080	0,104	0,050	24	0,042	0,052	0,046
7	0,034	0,147	0,049	28	0,056	0,118	0,235
8	0,074	0,140	0,111	29	0,046	0,151	0,189
10	NR	0,097	NR	30	0,047	0,169	0,247
11	0,092	0,247	0,393	32	0,069	0,110	0,073
12	0,053	0,087	0,041	34	0,059	0,072	0,045
14	0,087	0,108	0,148	35	0,082	0,089	0,036
16	0,058	0,101	0,134	37	0,035	0,114	0,037
19	0,062	0,067	0,030	38	0,031	0,114	0,054
21	0,057	0,158	0,075	39	0,045	0,163	0,037
23	0,065	0,119	NR	41	0,041	0,133	0,063
25	0,069	0,279	NR	42	0,064	0,067	0,036
27	0,055	0,091	0,080	44	0,058	0,119	0,074
31	0,072	0,207	0,072	45	0,093	0,118	0,208

NR – não realizado.