



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**TESE DE DOUTORADO**

**ALINE MICHELLE BARBOSA BAFICA**

**CAPACIDADE DE ANTÍGENOS DE *SCHISTOSOMA*  
*MANSONI* EM ALTERAR *IN VITRO* O FENÓTIPO DE  
MONÓCITOS E LINFÓCITOS NA LEISHMANIOSE  
CUTÂNEA**

Salvador, BA  
2012

**ALINE MICHELLE BARBOSA BAFICA**

**CAPACIDADE DE ANTÍGENOS DE *SCHISTOSOMA*  
*MANSONI* EM ALTERAR *IN VITRO*, O FENÓTIPO DE  
MONÓCITOS E LINFÓCITOS NA LEISHMANIOSE  
CUTÂNEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal da Bahia, como requisito para  
a obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Ilma Andrade Santos  
Araujo.  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Salvador – BA  
2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de  
Saúde, SIBI - UFBA.

B143 Bafica, Aline Michelle Barbosa

Capacidade de antígenos de *Schistosoma mansoni* em alterar  
*in vitro* o fenótipo de monócitos e linfócitos na leishmaniose  
cutânea / Aline Michelle Barbosa Bafica. – Salvador, 2012.  
82 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Ilma Andrade Santos Araujo.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Monócitos. 3. Células. I.  
Araujo, Maria Ilma Andrade Santos. II. Universidade Federal  
da Bahia.

CDU 616.993.161



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE DA DOUTORANDA Aline Michelle Barbosa Báfica.

Aos onze dias do mês de dezembro do ano de 2012 às 09 horas no auditório III, segundo andar no Instituto de Ciências da Saúde, se reúne em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araújo orientadora, Dr. Paulo Roberto Lima Machado, Dra. Clarissa Romero Teixeira, Dra. Márcia Cristina Aquino Teixeira, Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Tese intitulado: "CAPACIDADE DE ANTÍGENOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI* EM ALTERAR *IN VITRO*, O FENÓTIPO DE MONÓCITOS E LINFÓCITOS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA" da doutoranda, Aline Michelle Barbosa Báfica. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a Doutoranda teve a sua defesa de Tese APROVADA emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, e lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pela Doutoranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, onze de dezembro do ano de dois mil e doze.

Prof. Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araújo  
Orientadora

Prof. Dr. Paulo Roberto Lima Machado  
Banca Examinadora

Prof. Dra. Clarissa Romero Teixeira  
Banca Examinadora

Prof. Dra. Márcia Cristina Aquino Teixeira  
Banca Examinadora

Prof. Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli  
Banca Examinadora

Aline Michelle Barbosa Báfica  
Doutoranda

Prof. Dra. Maria de Fátima Dias Costa  
Coordenadora do PPGIm em exercício  
ICS/UFBA

Ao meu pai Nelson (*in memoriam*), minha  
mãe Dajuda e à minha filha Beatrice, pela  
expressão única do amor.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Profa. Ilma, nem todas as lindas palavras seriam suficientes para agradecer a orientação cuidadosa e dedicada e nem, para expressar a imensa admiração que tenho pela pessoa digna e ética que és.

**MUITO OBRIGADA!**

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Edgar Carvalho, chefe do Serviço de Imunologia, pelas valiosas críticas e sugestões ao trabalho.

À Dra. Luciana Cardoso, pelo incentivo e pelos valiosos questionamentos e ensinamentos, auxiliando-me neste trabalho, na minha formação científica e o mais importante pelo carinho e grande amizade.

Ao Dr. Ricardo Riccio, pelos ensinamentos e incentivo para a realização desse trabalho e também pela valorosa amizade.

Aos Dr. Sérgio Costa, Alex Loukas e Alfredo Góes pela contribuição tão importante neste estudo.

Ao Lago, Dr. Luis Henrique, Dr. Paulo Machado pelo suporte na área endêmica.

A Elbe e Lucinha pelo suporte na secretaria e amizade.

A todos os professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIIm).

Aos meus maravilhosos amigos Giuseppe, Rafael, Diego, Robson, Cecília, Joanemile, Jamille, Luciane e Gil, todos do laboratório de Alergia e Helminthíases, por compartilharem comigo as muitas alegrias nessa caminhada.

Agradeço à Thais Delavechia pela amizade e por sempre pacientemente me auxiliar na resolução das dificuldades encontradas acerca da citometria de fluxo.

Agradeço aos meus amigos do Serviço de Imunologia, pelo carinho e amizade.

Agradecimento especial aos indivíduos participantes da pesquisa.

À minha família pelo suporte em todos os momentos.

Ao meu amado Irineo, pelo amor, carinho e paciência.

A Deus, sempre, pela força que me dá.

“É preciso ousar, no sentido pleno desta palavra, para falar em *amor* sem temer ser chamado de *piegas*, de *meloso*, de a-científico, senão de anti-científico. É preciso ousar para dizer, cientificamente e não bla-bla-blantemente, que estudamos, aprendemos, ensinamos, conhecemos com o nosso corpo inteiro. Com os sentimentos, com as emoções, com os desejos, com os medos, com as dúvidas, com a paixão e também com a razão crítica. Jamais com, esta apenas. É preciso ousar para jamais dicotomizar o cognitivo 'do emocional. É preciso ousar para ficar ou permanecer ensinando por longo tempo nas condições que conhecemos mal pagos, desrespeitados e resistindo ao risco de cair vencidos pelo cinismo. É preciso ousar, aprender a ousar, para dizer *não* à burocratização da mente a que nos expomos diariamente. É preciso ousar para continuar...”.

Paulo Freire

## RESUMO

**Introdução:** Neste estudo, nós avaliamos os efeitos de alguns antígenos do *S. mansoni* sobre a resposta imune induzida pelo antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) em células de pacientes com LC. **Métodos:** CMSP foram estimuladas *in vitro* com SLA e cultivadas na presença ou ausência dos antígenos recombinantes do tegumento do *S. mansoni*, Sm29 e SmTSP-2 e também do PIII, uma fração do antígenos solúvel do verme adulto do *S. mansoni*. As citocinas do padrão Th1, Th2 e regulatória foram medidas nos sobrenadantes das culturas, utilizando-se a técnica de ELISA sanduíche. Adicionalmente, CMSP foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos para a avaliação do fenótipo destas células, utilizando-se os anticorpos para marcação de CD4, CD8, CD25, CD28, CTLA-4 e Foxp3 em linfócito T e CD14, CD16, HLA-DR, CD80 e CD86 em monócitos. Para tanto se utilizou a técnica de citometria de fluxo e as análises foram feitas pelo programa FlowJo. **Resultados:** A adição dos antígenos do *S. mansoni* às culturas de CMSP resultou na redução dos níveis de IFN- $\gamma$  em 37 a 50% dos pacientes. Embora, em menor extensão, os antígenos também foram capazes de diminuir a produção de TNF. Comparando os grupos de pacientes que tiveram ou não redução na produção de IFN- $\gamma$  e TNF em culturas estimuladas com SLA, pela presença dos antígenos de *S. mansoni*, observou-se que não houve diferença significativa no número e tamanho das lesões e nem nos níveis basais de IFN- $\gamma$  e TNF. Não houve também diferença significativa nos níveis de IL-10 e IL-5 em resposta aos antígenos de *S. mansoni* entre os grupos que apresentaram ou não redução na produção de IFN- $\gamma$  e TNF em resposta aos antígenos do *S. mansoni*. Adicionalmente, foi observado que o uso do rSm29 nas culturas de CMSP de pacientes com LC resultou em diminuição da expressão de HLA-DR em monócitos não-clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>), no entanto a adição de PIII diminuiu a expressão desta molécula em monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) e intermediários (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>). A adição do PIII e do rSmTSP-2 resultou na regulação da expressão de CD80 em monócitos não-clássicos e da expressão de CD86 em monócitos intermediários, respectivamente. Os antígenos rSmTSP-2 e PIII aumentaram a expressão de CTLA-4 em células TCD4<sup>+</sup> e também expandiram a frequência de células regulatórias TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>. **Conclusão:** Os antígenos usados neste estudo, modularam a resposta pro-inflamatória induzida pelo SLA *in vitro* em um grupo de pacientes com LC, e os antígenos rSmTSP-2 e PIII foram capazes de

diminuir o estado de ativação de monócitos e também aumentar a expressão de moléculas moduladoras em linfócitos T.

**Palavras-chave:** Antígenos de *Schistosoma mansoni*. Leishmaniose. Citocinas. Células Treg. Monócitos.

## ABSTRACT

**Introduction:** In this study, we evaluated the effects of some antigens of *S. mansoni* on the immune response induced by the soluble *Leishmania* antigen (SLA) in cells from CL patients. **Methods:** PBMC were stimulated with SLA *in vitro* and cultured in the presence or absence of the recombinant antigens from the tegument of *S. mansoni*, Sm29 and SmTSP-2 and also the PIII, a fraction of the soluble antigens from the adult worm antigens. Cytokines of the Th1, Th2 and regulatory profile were measured in supernatants of culture using the sandwich ELISA assay. Additionally, PBMC were stained with fluorochrome conjugated antibodies to CD4, CD8, CD25, CD28, CTLA-4 and Foxp3 in T lymphocyte and CD14, CD16, HLA-DR, CD80 and CD86 in monocytes. For this purpose, we used the technique of flow cytometry and the analyzes were performed using the Flow-Jo software. **Results:** The addition of *S. mansoni* antigens to the cultures resulted in reduction in IFN- $\gamma$  levels in 37 to 50% of patients. Although to a lesser extent, the antigens were also able to decrease the production of TNF. Comparing groups of patients that either had or did not have reduction in IFN- $\gamma$  and TNF production in cultures stimulated with SLA in the presence of *S. mansoni* antigens, we observed that there was no significant difference in the number and lesions size, and also in IFN- $\gamma$  and TNF basal levels. There was also no significant difference in the levels of IL-10 and IL-5 in response to *S. mansoni* antigens between the groups of patients who had or not reduction in the production of IFN- $\gamma$  and TNF in response to the *S. mansoni* antigens. Additionally, it was observed that the use of rSm29 to the PBMC cultures from CL patients resulted in reduction of HLA-DR expression on non-classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) monocytes, while the addition of PIII diminished the expression of this molecule on classical (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) and intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) monocytes. The addition of PIII and rSmTSP-2 resulted in down-modulation of CD80 expression on non-classical and CD86 expression on intermediate monocytes, respectively. These two antigens increased the expression of CTLA-4 in CD4<sup>+</sup> T cells and they also expanded the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. **Conclusion:** The antigens used in this study down-modulated the *in vitro* proinflammatory response induced by SLA in a group of CL patients. Moreover PIII and rSmTSP-2 were able to decrease the activation status of monocytes and also to up-regulate the expression of modulatory molecules in T lymphocytes.

**Keywords:** *Schistosoma mansoni* antigens. Leishmaniasis. Cytokines. Treg cells. Monocytes.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	15
<b>2. Revisão de literatura</b>	
2.1 Aspectos gerais sobre a LTA.....	17
2.2 Manifestações clínicas e Resposta imune.....	19
2.2.1 Ativação celular na LTA.....	22
2.3 Imunoterapia na leishmaniose.....	26
2.4 Resposta imune na infecção pelo <i>S. mansoni</i> .....	27
2.5 Modulação da resposta imune pelo <i>Schistosoma mansoni</i> nas doenças alérgicas.....	30
2.6 Modulação da resposta imune pelo <i>Schistosoma mansoni</i> nas doenças autoimunes.....	31
2.7 Papel dos antígenos recombinantes na imunomodulação pelo <i>S. mansoni</i> .....	33
<b>3. Hipótese e Objetivos</b> .....	35
<b>4. Capítulo 1:</b> Artigo Científico 1: <i>Schistosoma mansoni</i> antigens alter the cytokine response <i>in vitro</i> during cutaneous leishmaniasis.....	37
4.1 Introdução.....	38
4.2 Materiais e métodos.....	39
4.3 Resultados.....	40
4.4 Discussão.....	43
4.5 Referencias.....	44
<b>5. Capítulo 2:</b> Artigo Científico 1: Changes in T-cell and monocyte phenotypes <i>in vitro</i> by <i>Schistosoma mansoni</i> antigens in cutaneous leishmaniasis patients.....	47
5.1 Introdução.....	47
5.2 Materiais e métodos.....	48
5.3 Resultados.....	49
5.4 Discussão.....	50
5.5 Referencias.....	54
5.6 Resumo de resultados.....	57
<b>6. Discussão</b> .....	58
<b>7. Conclusão</b> .....	65
<b>Referências</b> .....	66
<b>Anexos</b> .....	77

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	18
Figura 2. Espectro clínico e imunológico da leishmaniose tegumentar.....	20
Figura 3. Subgrupos de monócitos baseados na expressão de CD14 e CD16 (clássicos, intermediários e não-clássicos) por citometria de fluxo.....	25
Figura 4. Resposta imune na esquistossomose.....	29

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APC	Células apresentadoras de antígenos
B7.1 e B7.2	Moléculas co-estimulatórias
CD	Do inglês “clusters of differentiation”
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CTLA-4	Do inglês “Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4”
CY	Cycrhome
ELISA	Do inglês “Enzyme Like Immunosorbent Assay”
FACS	Citometria de fluxo (flow citometer cell sorter)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Foxp3	Fator de transcrição de células regulatórias
FSC	Dispersão frontal
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
MIF	Média de intensidade de fluorescência
NLR	Receptor tipo NOD
NO	Óxido nítrico
PE	Ficoeritrina
PMB	Polimixina B
Sb <sup>v</sup>	Antimonial pentavalente
SWAP	Antígeno Solúvel do Verme Adulto do <i>S. mansoni</i>
T CD4 <sup>+</sup>	Linfócitos T auxiliares CD4 positivo
T CD8 <sup>+</sup>	Linfócitos T auxiliares CD 8 positivo
Th	Do inglês: “T helper”
Th1	Linfócitos T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliar tipo 2

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as seis doenças prioritárias no programa de controle de doenças da Organização Mundial de Saúde, por afetarem grande parte da população pobre de países em desenvolvimento. Esta doença tem sido considerada como doença negligenciada, por não haver interesse pelas indústrias farmacêuticas, em investir no desenvolvimento de novos medicamentos contra essa patologia. Há mais de 50 anos o tratamento utilizado contra a LTA são os antimoniais pentavalentes (Sbv), mas essa terapêutica pode causar falhas devido a diferentes esquemas posológicos utilizados, insucesso terapêutico ou recidiva, limitando o controle adequado da doença. Tem sido relatada, em até 37% dos casos, falha no tratamento anti-leishmaniose (SAENZ e cols, 1991). Outro estudo, entretanto, realizado em Corte de Pedra/BA, relatou que 17% dos pacientes com LTA apresentam recidiva quando tratados com Sb<sup>v</sup> em períodos variáveis de tempo (NETTO e cols, 1990). O uso de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos é limitado, pois o custo total do tratamento é muito caro e pode ocorrer desenvolvimento de resistência ao tratamento (BRASIL, 2000).

Atualmente têm sido estudadas novas possibilidades para tratar doenças de base imunológica, utilizando imunoterápicos. Tem sido demonstrado que a infecção por helmintos ou mesmo a estimulação com antígenos oriundos destes parasitos tem o potencial de modular as respostas mediadas pela ativação das células do tipo Th2, a exemplo das doenças alérgicas, e também modular a resposta do tipo Th1, envolvida na patogênese das doenças autoimunes.

A patogênese da LTA envolve elevada produção de IFN- $\gamma$  e TNF, enquanto que a infecção crônica pelo *S. mansoni* induz resposta do tipo Th2 e T regulatória (Treg). Pouco se sabe sobre o papel das Tregs na LTA. Elas são descritas em diversas doenças infecciosas, tanto do padrão Th1 como do Th2, e podem atuar na modulação da intensidade e duração da resposta inflamatória, limitando o dano tecidual (BELKAYD e TARBELL, 2009; BELKAYD e cols, 2002). Outras células como os monócitos humanos também têm sido descritas por sua presença em infecção e inflamação, mas também pouco é relatado sobre seu papel na LTA. A IL-10, produzida por esses subtipos celulares em alguns modelos, a exemplo de infecção crônica pelo *S. mansoni*, tem sido descrita por atuar na modulação da resposta imune envolvida nas doenças que

cursam com a exacerbação da resposta inflamatória (FIORENTINO e cols, 1989; ELLIOTT e cols, 2003; LA FLAMME e cols, 2003; SEWELL e cols, 2003).

Neste estudo, avaliamos os efeitos da adição dos antígenos do *S. mansoni* sobre a resposta imune induzida pelo antígeno de *Leishmania* (SLA) em monócitos e linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea, na tentativa destes antígenos alterar o estado de ativação dessas células e modular a resposta inflamatória exacerbada. Esta modulação teoricamente poderia reduzir o tempo de cicatrização e o tamanho das lesões, bem como a necessidade do uso de vários ciclos antimoniais por paciente com LTA. Os nossos achados justificam a continuação de estudos na busca da identificação de antígenos do *S. mansoni* capazes de induzir a modulação da resposta inflamatória associada ao desenvolvimento da LTA.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A LTA

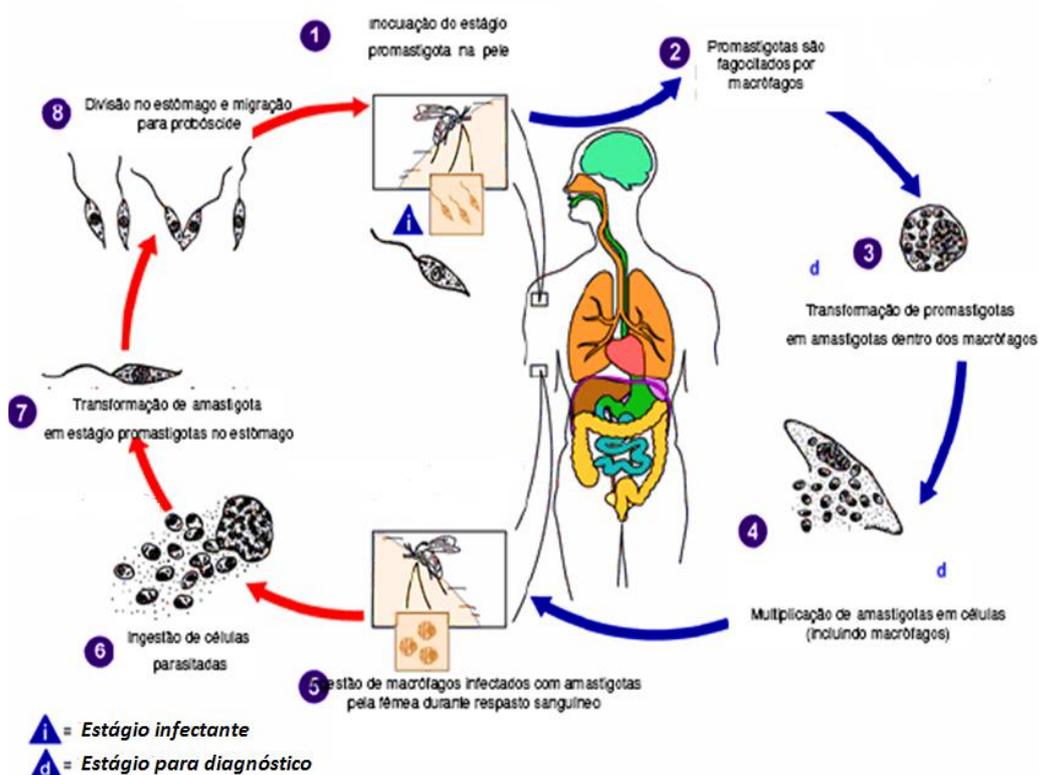
A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença endêmica na América Latina, África e Ásia, causada por uma variedade de espécies de *Leishmania* transmitidas pela picada do inseto vetor infectado. A doença é considerada, no Brasil, uma antropozoonose de notificação compulsória com importância crescente, devido a um aumento no número de casos nos últimos anos e ao surgimento da doença em regiões não relatadas anteriormente (AMATO-NETO, 2008).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a LTA tem sido considerada como um grave problema de saúde pública no Brasil, sendo associada a altas taxas de morbidade (WHO, 2011). A prevalência geral é de 12 milhões de pessoas com uma população de risco de 350 milhões de indivíduos que estão expostos à infecção, sendo a incidência da doença cutânea de 1 a 1,5 milhão de casos/ano (DESJEUX, 2001). A LTA tem alta incidência no estado da Bahia, 23.4/100.000 hab, sendo distribuída em áreas de atividade agrícola, com desmatamento (SVS/MS, 2009).

A LTA é uma doença cutânea causada pelo parasito do gênero *Leishmania* através da picada do inseto vetor do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) quando formas infectantes do parasito (promastigotas) são inoculadas no hospedeiro vertebrado (Figura 1). Logo após a entrada do parasito, as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos, onde assumem a forma amastigota nos vacúolos fagocíticos, passando por ciclos intracelulares de multiplicação exponencial (NEVES, 2011; DE ALMEIDA e cols, 2003).

Embora a resposta imunológica seja fundamental para a defesa contra a maioria de agentes infectantes, evidências têm sido acumuladas nos últimos anos de que em muitas doenças infecciosas, os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim com uma resposta imune anormal. A resposta imune é de fundamental importância para a defesa e proteção do hospedeiro anti-leishmania desde o momento da inoculação do parasito através da picada do mosquito, entretanto um desequilíbrio entre a relação parasito e hospedeiro pode levar a uma desregulação imune.

Figura 1. Ciclo de vida da *Leishmania* spp.



Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

## 2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E RESPOSTA IMUNE

A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que varia desde lesões cutâneas localizadas ou disseminadas até graves lesões mucocutâneas e isso pode estar relacionado à espécie do parasito, bem como a resposta imune exacerbada. Entre elas estão incluídas a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose disseminada (LD) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Figura 2) (MARSDEN, 1990).

A leishmaniose tegumentar americana vem sendo estudada, por pesquisadores do Serviço de Imunologia, desde meados de 1980, na área endêmica de Corte de Pedra, Bahia, uma área de transmissão de *L. braziliensis* (GRIMALDI e cols, 1989). A *L. braziliensis* é o principal agente causal da LC e da LM na América Central e América do Sul. A LC é caracterizada por uma úlcera cutânea bem delimitada com bordas elevadas. Aproximadamente, 3% dos pacientes com LC desenvolvem LM, concomitantemente ou meses após o aparecimento da úlcera cutânea, lesões desfigurantes principalmente na mucosa nasal, podem aparecer também no palato, faringe e laringe (JONES e cols, 1987). Do ponto de vista histopatológico as lesões de LC e LM são caracterizadas por um processo inflamatório com linfócitos e plasmócitos e com raros ou até mesma ausência de parasitos (BITTENCOURT e BARRAL, 1991). Observa-se uma forte resposta linfoproliferativa ao antígeno de *Leishmania* (SLA) e positividade ao teste intradérmico (CARVALHO e cols, 1985). A LD é considerada como uma forma emergente, pelo aparecimento de múltiplas lesões em pelo menos duas partes do corpo (TURETZ e cols, 2002). Ao exame histopatológico na LD é observada a presença de linfócitos e macrófagos pouco parasitados (CARVALHO e cols, 1994). Os pacientes acometidos com LCD não apresentam lesões ulceradas clássicas, mas lesões nodulares em múltiplas partes do corpo, diferindo das outras formas de LTA. Ao exame histopatológico na LCD é observada a presença de macrófagos parasitados (BITTENCOURT e cols, 1990).

Figura 2. Espectro clínico e imunológico da leishmaniose tegumentar.



	Pólo hiperérgico [+]		Infecção subclínica	Pólo anérgico [-]	
	LM	LC	↓	LD	LCI
Parasitas	+/-	+	?	+/++	++++
Im.celular	+++	++	+	+/-	-

Adaptado de Guimarães e cols, 2005.

Os mecanismos imunológicos associados à leishmaniose tegumentar levam à destruição tecidual, culminando com o aparecimento da úlcera leishmaniótica que é a manifestação clínica mais importante nesta doença. Diante disso, um estudo de BACELLAR e cols (2002), sugere que a diferença nos padrões de progressão da doença está relacionada a perfis distintos de produção de citocinas, estabelecidos em resposta à infecção.

Em modelos experimentais de leishmaniose e em humanos, a resposta imune do T “helper” 1 (Th1) tem importância no controle da infecção por *Leishmania*. Já está bem documentado que a produção de IFN- $\gamma$ , citocina produzida principalmente pelas células Th1, é importante para o controle da infecção por *Leishmania* pela estimulação da produção de agentes oxidantes derivados dos macrófagos (MURRAY e cols, 1983; LIEW e cols, 1991; BOGDAN e cols, 2000). Entretanto, nas formas LM e LC, apesar de existir uma resposta imune protetora do tipo Th1, os pacientes evoluem para a doença.

Evidências têm sido acumuladas de que a resposta imune exacerbada participa da lesão tecidual da leishmaniose tegumentar: 1) Os pacientes com LC e LM produzem níveis altos de IFN- $\gamma$  e também da citocina pró-inflamatória TNF existindo uma associação entre produção de IFN- $\gamma$  e TNF e tamanho da lesão, assim como o aparecimento de formas mais graves da doença (RIBEIRO-DE-JESUS e cols, 1998; ANTONELLI e cols, 2005; OLIVEIRA e cols, 2011); 2) Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LM e LC quando estimuladas com antígeno de *L. braziliensis in vitro* produzem baixos níveis ou não produzem a citocina regulatória IL-10 (BACELLAR e cols, 2002); 3) Os níveis de TNF e IFN- $\gamma$  no soro e em sobrenadantes de culturas de células estimuladas com o antígeno de *Leishmania* diminuem significativamente após o tratamento (RIBEIRO-DE-JESUS e cols, 1998; ANTONELLI e cols, 2005; BACELLAR e cols, 2002; MARIA e cols, 2005; DA-CRUZ e cols, 1996 ).

Rocha e cols mostraram que a neutralização de IL-10 aumentou a produção de IFN- $\gamma$  por CMSP e também a proliferação de linfócitos em pacientes com LC (ROCHA e cols, 1999). A IL-10 parece desempenhar um papel importante na modulação das respostas inflamatórias associadas ao desenvolvimento de leishmaniose cutânea, esta citocina, no entanto, em modelo murino de infecção por *L. major* mantém a infecção em estado de latência (BELKAID e cols, 2001). Bacellar e cols demonstraram que CMSP de pacientes com LM expressam altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF e apresentam uma baixa capacidade de modulação da resposta inflamatória por IL-10 e TGF- $\beta$  (BACELLAR e cols, 2002).

Na leishmaniose disseminada observa-se também produção de IFN- $\gamma$  e TNF por células mononucleares após estímulo com SLA. Pacientes com LD podem apresentar resultado positivo ou negativo ao teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania*. A LD tem sido considerada uma forma intermediária entre a LC e a LCD (CARVALHO e cols, 1994). Diferentemente da LC e LM, a leishmaniose cutânea difusa tem sido relacionada a uma fraca resposta do tipo Th1, com a propagação da doença, entretanto sem a destruição do parasito. É considerada uma doença anérgica com o resultado negativo do teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania*. Estudo mostrou que pacientes com LCD, apresentam uma baixa expressão de RNAm de IFN- $\gamma$  e um aumento no RNAm da citocina regulatória IL-10 sendo que, após tratamento, observa-se uma restauração da resposta Th1, com uma melhora clínica dos pacientes. A resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- $\gamma$  por CMSP é também

baixa ou ausente, entretanto existe produção de IL-2, IL-4 e IL-10 no tecido (BOMFIM e cols, 1996). Essa ausência de resposta imune Th1 favoreceria a multiplicação e disseminação do parasito.

Em relação aos indivíduos subclínicos, residentes em áreas endêmicas de leishmaniose, mas que não desenvolveram a doença tem sido descrito um equilíbrio entre a resposta pró-inflamatória, caracterizada por uma elevada produção de IFN- $\gamma$  e TNF, e a resposta reguladora com a produção de IL-10 (Figura 2) (FOLLADOR e cols, 2002).

### 2.2.1 ATIVAÇÃO CELULAR NA LTA

A resposta imune inata inclui receptores de reconhecimento padrão (receptores do tipo Toll, NLR) produtos solúveis (complemento, e citocinas, incluindo interleucina IL-1a, IL-12, TNF) e os neutrófilos, monócitos, macrófagos, células NK e células dendríticas que podem levar, especialmente através da produção de IL-12 ou IFN- $\gamma$  no caso das células NK, à indução da imunidade celular adquirida. Estes mecanismos conduzem à ativação de células específicas TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, onde, através de moléculas de adesão e quimiocinas, são ativamente recrutadas para os sítios da infecção e, partilha com o influxo de monócitos, resposta inflamatória local, incluindo formação de granuloma e desenvolvimento de lesão tecidual (MCSORLEY e cols, 1996; ABBAS, 2012).

Tem sido relatado que em doença cutânea humana causada por *L. braziliensis*, subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> do tipo Th1, produtoras de citocinas, são uma importante fonte de IFN- $\gamma$ , com muito pouco ou indetectáveis números de células TCD4<sup>+</sup> produtoras de IL-4 e IL-5. Neste mesmo estudo, foram identificadas células TCD4<sup>+</sup> e monócitos como importantes fontes de IL-10 (BOTTREL e cols, 2001).

A imunidade mediada pelas células Th1 é importante na proteção contra *Leishmania* e a ativação dessas células depende de sinais enviados por moléculas co-estimulatórias. Essas moléculas têm uma função importante na proliferação e manutenção da resposta imune celular. A ativação das células T é também influenciada por células apresentadoras de antígenos, através da expressão de moléculas co-estimulatórias, também nestas células, resultando em eficiente ativação e proliferação

das células T e produção de citocinas por essas células (ELLOSO e SCOTT, 1999). Para uma ótima ativação, a célula T requer então pelo menos dois sinais independentes: (1) um sinal dado pela ligação do complexo peptídeo-complexo de histocompatibilidade principal (MHC) ao receptor de células T; (2) por um sinal co-estimulatório que é emitido pela ligação de moléculas B7 (B7-1 ou B7-2), presentes nas células apresentadoras de antígenos, a exemplo de macrófagos, com a molécula CD28 nas células T. Esses sinais, transmitidos através da molécula CD28, resultam na ativação eficiente e na proliferação de células T induzidas por antígeno, sobrevivência prolongada das células e produção de citocinas. Após a ativação, as células T passam a exibir um receptor adicional, CTLA-4 (CD152), homólogo ao CD28, que se liga às moléculas B7, limitando assim a resposta proliferativa das células T ativadas (WALUNAS e cols, 1994).

Favali e cols demonstraram que a adição do anticorpo CTLA-4 *in vitro* para bloquear a interação CD28-B7 em culturas de células do sangue periférico de pacientes com LC estimuladas com antígeno de *Leishmania* levou a uma modulação na produção de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF (FAVALI e cols, 2005). Estudo similar, ao avaliar a produção de citocinas através do bloqueio das moléculas CD80 e CD86, em macrófagos humanos infectados por *L.major*, demonstrou significativa redução na produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-12 (BRODSKYN e cols, 2001). Esse estudo sugere que a regulação da expressão dessas moléculas co-estimulatórias por macrófagos tem um importante papel na resposta imune contra a *Leishmania*.

A IL-10, uma citocina regulatória da resposta imune celular possui também a capacidade de reduzir a expressão do MHC-II e de moléculas co-estimulatórias, como também de inibir a produção de outras citocinas, tais como IFN- $\gamma$  e TNF (FIORENTINO e cols, 1989; BOGDAN & NATHAN 1993).

Muitos outros tipos de células e citocinas podem ter um importante papel na imuno-regulação de doenças cutâneas incluindo populações de células Th17 e células T regulatórias. As células T auxiliares que produzem IL-17 (Th17) têm sido mostradas por terem um papel crucial na patogênese das doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (HASHIMOTO e cols, 2005; MATSUZAKI & UMEMURA, 2007; MOSELEY e cols, 2003). Embora a IL-17 participe dos mecanismos de defesa contra certos patógenos, pouco se sabe sobre a função desta citocina em doenças infecciosas humanas: Um estudo de BACELLAR e cols (2009) mostrou um aumento na produção de IL-17 por

CMSPs e correlação positiva dos níveis desta citocina e TNF durante o curso da infecção em pacientes com LC e LM. A IL-17 foi detectada nas lesões provocadas por *L. braziliensis* podendo indicar também o envolvimento desta citocina na patogênese da LTA.

As células T regulatórias (Treg) são capazes de modular a intensidade e a duração de ambas as respostas imunes Th1 e Th2 em doenças infecciosas, limitando danos ao tecido (BELKAYD e TARBELL, 2009; BELKAYD e cols, 2002). Recentemente, Salhi e cols (2008) identificaram células Treg em CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea localizada ativa e os curados espontaneamente. Outro estudo identificou, em lesões de pele de pacientes infectados com *L. guyanensis*, a presença de célula Treg tanto na fase aguda quanto na crônica *in vitro* com ação supressora (BOURREAU e cols, 2009). Portanto, os estudos sobre a ação supressora das células T regulatórias na LTA ainda não estão bem esclarecidos.

As células da resposta imune inata, através dos monócitos, participam ativamente da resposta imune na leishmaniose. Por mais de duas décadas, os monócitos foram classificados em clássicos ( $CD14^+ CD16^-$ ) e inflamatórios, aqueles que expressam a molécula CD16 e produzem níveis elevados de TNF (PASSLICK e cols, 1989). A frequência de  $CD14^+ CD16^+$  em pacientes com LC foi encontrada significativamente maior em comparação com controles saudáveis e foi positivamente correlacionada com o tamanho da lesão (SOARES e cols, 2006).

Recentemente, foram descritas diferentes sub-populações de macrófagos humanos e o papel dessas células na infecção e inflamação. Além dos monócitos “clássicos” que são fortemente positivos para a molécula de superfície CD14 ( $CD14^{++} CD16^-$ ), foi caracterizada outra população de monócitos que co-expressam CD16 (Fc $\gamma$ RIII). Uma nova nomenclatura tem sido usada para classificar estes monócitos de sangue humano em três subtipos: clássico ( $CD14^{++} CD16^-$ ), intermediário ( $CD14^{++} CD16^+$ ) e não-clássico ( $CD14^+ CD16^{++}$ ) (Figura 3) (ZIEGLER-HEITBROCK e cols, 2010). Os monócitos clássicos representam 85% dos monócitos totais e são caracterizados pela expressão de IL-13R $\alpha$ 1, IL-10 e RANTES e pela expressão de genes associados com propriedades anti-apoptose e cicatrização. Os monócitos intermediários representam 5% dos monócitos, expressam elevados níveis de HLA-DR, e estão associados com o processamento e apresentação de antígenos e ativação de células T. Os monócitos não-clássicos representam 10% de monócitos humanos, produzem TNF,

em resposta ao LPS *in vitro* e expressam genes associados ao rearranjo do citoesqueleto, exibindo um comportamento de "patrulheiro" *in vivo* (WONG e cols, 2011; WONG e cols, 2012). Expansão dos monócitos intermediários e não-clássicos na tuberculose, hepatite B, hepatite C, HIV e Dengue (ZHANG e cols, 2011; RODRIGUEZ-MUNOZ e cols, 2011; HAN e cols, 2009; AZEREDO e cols, 2010). O papel destes subgrupos de monócitos na leishmaniose ainda não foi esclarecido.

Figura 3. Subgrupos de monócitos baseados na expressão de CD14 e CD16 (clássicos, intermediários e não-clássicos) por citometria de fluxo.

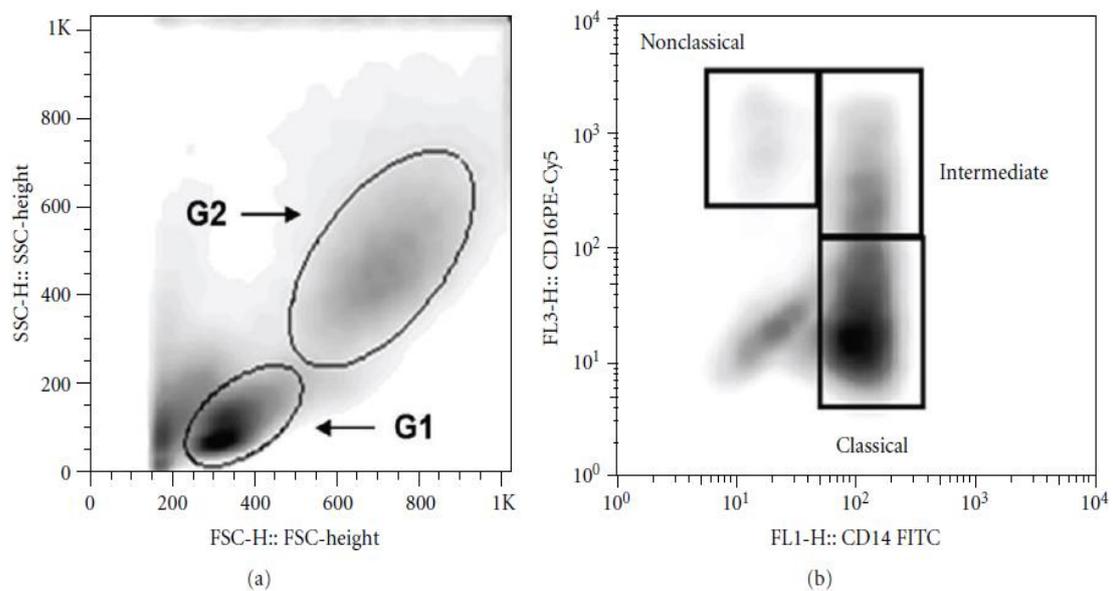


Figura adaptada de Bafica AM e cols, 2012.

### 2.3 IMUNOTERAPIA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Há mais de meio século, a terapêutica anti-leishmaniose utilizada são os antimoniais pentavalentes, com a utilização diária de injeções em um período de 20 dias, para tratar as formas cutâneas e disseminadas. Embora com o tratamento adequado, ainda é frequente a ocorrência de reações colaterais, recidivas e/ou comprometimento de mucosas, ocorrendo em cerca de 2% nos pacientes tratados e em quase 10% nos casos não tratados (BRASIL, 2000). O uso de drogas mais eficazes e menos tóxicas é limitada porque o custo total do tratamento é muito alto e há receio de desenvolvimento de resistência às drogas. O entendimento sobre o equilíbrio entre a resposta imune protetora Th1 anti-*Leishmania* e a regulação dessa resposta, como observado em indivíduos subclínicos pode contribuir para novas estratégias de controle e prevenção da LTA. A associação de um imunomodulador à terapia convencional pode resultar em profilaxia e/ou cura terapêutica da doença.

Recentemente, ensaios clínicos randomizados, duplo-cegos, placebo controlado têm demonstrado a importância do uso de imunomodulador na cura rápida da lesão e na redução dos efeitos colaterais causados pelo antimônio. O rhGM-CSF, uma glicoproteína que atua na indução de colônias de granulócitos e/ou macrófagos, pode alterar a resposta imune à *Leishmania*. O GM-CSF, *in vitro*, aumenta a ativação de macrófagos, atividade microbicida, cicatrização e cura da lesão (HO e cols, 1990; LIESCHKE e BURGUESS, 1992; JONES, 1993). Um estudo realizado com dez pacientes com leishmaniose cutânea residentes na área endêmica de Corte de Pedra, utilizando injeções intralesionais de rhGM-CSF, associado à terapia convencional antimonial, resultou em redução significativa no tempo de cura em mais de 50% (até 40 dias) quando comparado com os pacientes tratados com antimonial e placebo (ALMEIDA e cols, 1999). Esse tratamento levou a um aumento significativo da produção de IL-10 por CMSP comparado ao grupo que só fez uso do antimonial. Em outro estudo desse grupo, Santos e cols (2004) avaliaram o efeito da associação do uso do antimonial ao rhGM-CSF tópico, com aplicação de três vezes por semana durante três semanas, no tratamento de pacientes com LC comparando com o tratamento com antimonial e placebo. Foi observada uma redução significativa do tempo de cicatrização na LC após um ano de acompanhamento, em relação ao grupo placebo, sem efeitos colaterais e sem recidiva da doença.

Outro imunomodulador da resposta imune, o imiquimod, tem sido descrito por ser um modificador da resposta imune local, onde em um estudo de 1999, mostrou ser um tratamento eficaz em modelo experimental de leishmaniose (BUATES e MATLASHEWSKI, 1999). Imiquimod estimula a resposta Th1, aumentando a produção de TNF, IFN- $\gamma$  e IL-12 (KAPSENBERG, 2003), estimula também a produção de óxido nítrico pelo macrófago, reduzindo o número de parasitos, *in vitro*. Em ensaio clínico randomizado, duplo-cego, realizado em 40 pacientes infectados pela *L. peruviana* ou *L. braziliensis*, residentes das regiões endêmicas dos Andes peruanos e da selva peruana, os pacientes foram divididos em dois grupos para avaliar a eficácia da combinação de imiquinod em 5% em uso tópico e antimonial pentavalente comparada ao uso de antimonial isolado durante vinte dias no tratamento da LC. O número de pacientes que alcançou a cura clínica até o terceiro mês após o tratamento, foi maior no grupo tratado com imiquimod e antimonial, não sendo observado em seis e doze meses após o tratamento (MIRANDA-VERÁSTEGUI e cols, 2005). Esses estudos sugerem que combinações terapêuticas com imunomoduladores têm vantagens sobre a terapêutica clássica não associada.

Estudos recentes vêm demonstrando que infecção pelo parasito *S. mansoni* ou uso dos produtos do mesmo, pode prevenir o processo inflamatório em doenças mediadas pela resposta Th1 e ativação macrofágica. Uma vez identificados, antígenos de *S. mansoni* com a capacidade de prevenir a produção de mediadores da inflamação pelos monócitos/macrófagos, poderão ser produzidos e testados quanto à segurança e eficácia na prevenção ou tratamento das doenças mediadas pela exacerbação da resposta imune, a exemplo da leishmaniose cutânea.

#### 2.4 RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO *S. MANSONI*

A esquistossomose mansônica é uma doença infecciosa parasitária, causada por um trematódeo (*Schistosoma mansoni*) da família *Schistosomatidae*, cuja evolução clínica pode variar desde formas assintomáticas até as formas graves. A esquistossomose humana pode ser causada por cinco diferentes espécies de trematódeos digenéticos: *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S.*

*mekongi*, sendo o *S. mansoni*, a espécie responsável pela infecção no Brasil (NEVES, 2011).

Estima-se que pelo menos 200 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas pelo *Schistosoma*, e outras 600 milhões estejam sob o risco de infecção por uma das cinco espécies que infectam o homem (WHO/TDR, 2002). Apesar de uma das seis principais regiões de transmissão da esquistossomose estar localizada na África Subsaariana, com 85% do total dos casos de esquistossomose mundial (CHITSULO e cols, 2000), o Brasil, e principalmente a Bahia, possui transmissão elevada de *Schistosoma* (CARMO, 1999).

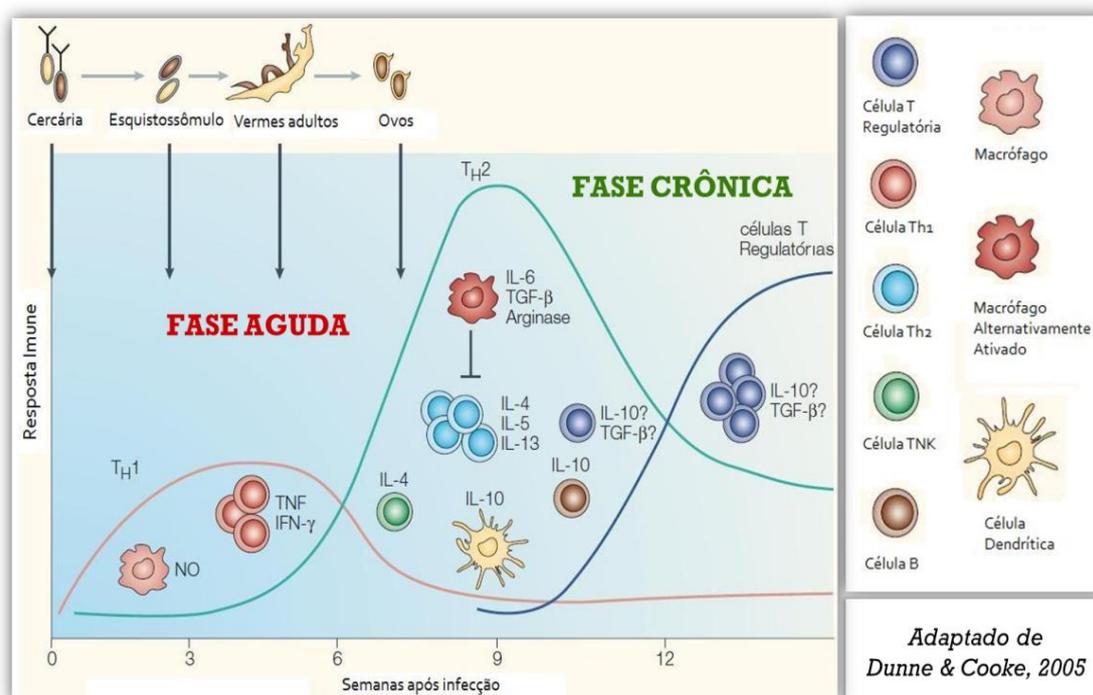
A infecção ocorre quando a cercária, liberada pelo hospedeiro intermediário (*Biomphalaria*), penetra na pele do hospedeiro humano durante o contato com a água contaminada. Uma vez no interior desse hospedeiro, a cercária evolui para esquistossômulo, migra para a região da veia porta do fígado, onde amadurecem até vermes adultos e, estes migram para os ramos terminais da veia mesentérica inferior, principalmente na altura da parede intestinal do plexo hemorroidário, onde se acasalam e, as fêmeas iniciam a ovoposição (NEVES, 2011).

São reconhecidas duas formas clínicas nos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, a forma aguda e a crônica, com diferentes respostas imunológicas no hospedeiro, e distintas manifestações clínicas. A esquistossomose aguda tem sido descrita como uma síndrome toxêmica, que ocorre antes do aparecimento dos ovos nas fezes e surge geralmente entre 6 a 8 semanas após a infecção e está associada à passagem dos esquistossômulos pelos pulmões (LAMBERTUCCI, 1993; RABELLO e cols, 1997; DE JESUS e cols, 2002). Esta forma da esquistossomose é mais comum em indivíduos que não residem em áreas endêmicas, sugerindo que ocorre algum tipo de modulação na resposta de indivíduos que estão em constante exposição ao *S. mansoni*. A fase aguda cursa com uma marcante resposta pró-inflamatória, predominando a resposta do tipo T auxiliar 1 (Th1), sendo demonstrados altos níveis de TNF no plasma e, após o estímulo das células mononucleares de sangue periférico *in vitro* com antígenos do parasito, observa-se elevada produção de TNF, IL-1 e IL-6, além de IFN- $\gamma$  (DE JESUS e cols, 2002).

Na esquistossomose, embora o desenvolvimento de uma resposta Th1 e Th17 seja observado na infecção aguda pelo *S. mansoni*, em modelo murino, eles rapidamente declinam e são substituídos por uma resposta Th2, capaz de regular, juntamente com IL-

10, a produção e as funções efetoras dos mediadores liberados na fase aguda da doença (MONTENEGRO e cols, 1999). Essa rápida mudança é inicialmente benéfica para o hospedeiro, mas o aparecimento e persistência da resposta Th2 podem contribuir na evolução para a fibrose hepática (WYNN, 2007). Esta mudança no padrão de resposta tem sido relacionada à produção de IL-4 e IL-10 induzidas por antígenos do ovo do parasito (SHER e cols, 1991; BRUNET e cols, 1997; MONTENEGRO e cols, 1999; VAN DER KLEIJ e cols, 2002; SILVEIRA e cols, 2004). As células regulatórias e os macrófagos têm sido implicados como as principais fontes produtoras de IL-10 neste processo de modulação e estão associados à modulação da resposta imune do tipo Th2 da fase crônica e prevenção da fibrose na esquistossomose (HESSE e cols, 2004; MCKEE e PEARCE 2004, HOFFMANN e cols, 2000; PEARCE E MACDONALD, 2002; BOOTH e cols, 2004) (Figura 4).

Figura 4: Resposta imune na esquistossomose



Em indivíduos cronicamente infectados pelo *Schistosoma*, que vivem em área endêmica, não se observam fenômenos de anafilaxia, apesar de elevada produção de IgE

e da presença de mastócitos e eosinófilos, possivelmente isso se decorre também da presença de IL-10 e células regulatórias.

Tem sido demonstrado que a infecção por helmintos ou mesmo a estimulação com antígenos oriundos destes parasitos têm o potencial de modular as respostas mediadas pela ativação de células do tipo Th1 e Th2, em atenuar as doenças autoimunes, doenças inflamatórias crônicas e doenças alérgicas. Isso porque os antígenos de *S. mansoni* são capazes de induzir a produção de IL-10 (CORREA-OLIVEIRA e cols, 1998; VELUPILLAI e cols, 2000; VAN DER KLEIJ e cols, 2002; PACIFICO e cols, 2006).

## 2.5 MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR *SCHISTOSOMA MANSONI* NAS DOENÇAS ALÉRGICAS

Estudos realizados no Serviço de Imunologia (SIM) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) têm demonstrado que, em indivíduos infectados com alta carga parasitária de *S. mansoni*, residentes em uma área endêmica na Bahia, apresentavam uma menor prevalência de positividade aos testes cutâneos de alergia quando comparados com indivíduos não infectados ou infectados com baixa carga e residentes na mesma área (ARAUJO e cols, 2004). A gravidade da asma em indivíduos residentes nesta região foi também avaliada em um estudo prospectivo com duração de um ano e foi observado que indivíduos residentes na área endêmica para *S. mansoni*, a asma foi menos grave comparando-se com asmáticos não infectados residentes em uma área rural e uma área urbana com as mesmas condições sócio-econômicas (MEDEIROS e cols, 2003). Corroborando com estes dados, em estudo realizado na área endêmica para *S. mansoni* no município do Conde-Bahia, Araujo e cols (2004), demonstraram que indivíduos infectados pelo *S. mansoni* apresentavam formas leves da asma e que, após o tratamento com anti-helmínticos, houve uma piora nas manifestações clínicas da doença.

Diante destes resultados, foram estudados os mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune em asmáticos infectados por *S. mansoni*. Quando comparadas culturas de células de indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni* estimuladas com o antígeno 1 do principal ácaro na nossa região, o *Dermatophagoides*

*pteronyssinus* (Der p1) com asmáticos não infectados provenientes do Ambulatório de Alergia do HUPES-UFBA, foi observado que a produção de citocinas do tipo Th2, IL-4 e IL-5, por células dos asmáticos infectados, foi significativamente menor do que o encontrado nos asmáticos não infectados. Por outro lado, a produção de IL-10 foi elevada nos asmáticos infectados e muito baixa ou ausente nos não infectados (ARAUJO e cols, 2004). Além disso, houve uma associação positiva entre a produção de IL-10 específica para o Der p1 e o número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes. O papel da IL-10, na regulação da resposta imune de indivíduos asmáticos parasitados por helmintos, foi avaliado através da adição desta citocina às culturas de células mononucleares de sangue periférico de asmáticos não infectados por helmintos. Estes indivíduos normalmente produzem baixos níveis de IL-10 específicos para Der p1, e a presença desta citocina nas culturas resultou na modulação da produção de IL-5 específica para o alérgeno.

A IL-10 é capaz de promover uma diminuição da liberação de histamina e de outros mediadores pelos mastócitos (ROYER e cols, 2001) e de inibir a produção de citocinas Th2 envolvidas na patogênese da asma (ARAUJO e cols, 2004), e considerando que a resposta imune a antígenos de *S. mansoni* leva à produção de IL-10, é possível que antígenos de *S. mansoni*, devido à estimulação de grande produção desta citocina, sejam capazes de modular a resposta inflamatória não apenas em resposta a alérgenos na asma, mas também em doenças humanas mediadas pela resposta do tipo Th1.

Uma vez identificados antígenos do *S. mansoni* com a capacidade de prevenir a produção de mediadores da inflamação, eles poderão ser produzidos e testados quanto à segurança e eficácia na prevenção ou tratamento das doenças mediadas pela exacerbação da resposta imune.

## 2.6 MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR *SCHISTOSOMA MANSONI* NAS DOENÇAS AUTOIMUNES

Existem evidências na literatura de que a infecção pelo *Schistosoma mansoni* ou produto do parasito modulam a resposta imune do tipo Th2 associado às alergias, e também a resposta inflamatória do tipo Th1, envolvida na patogênese das doenças

autoimunes. A patogênese da maioria das doenças autoimunes envolve a produção de IFN- $\gamma$  e TNF, enquanto que a infecção crônica pelo *S. mansoni* induz as respostas do tipo Th2 e regulatória, a exemplo da produção de IL-10. A IL-10, descrita em 1989, por FIORENTINO e cols, é uma citocina produzida por monócitos/macrófagos, células Th2 (DEL PRETE e cols, 1993) e pelas células T regulatórias recentemente descritas (READ e POWRIE, 2001). Devido à capacidade modulatória da IL-10 e desta citocina ser produzida durante a infecção crônica pelo *S. mansoni*, tem sido estudado o papel da infecção por esse helminto ou produtos do mesmo, na prevenção de doenças autoimunes.

Em modelo murino, foi observado que a infecção pelo *S. mansoni* ou a injeção do ovo do parasito, ou ainda a injeção do extrato do verme adulto previne o aparecimento de diabetes insulino-dependente em camundongos NOD (COOKE e cols, 1999). Desde que o diabetes insulino-dependente é mediado pela resposta imune do tipo Th1 contra antígenos das células beta-pancreáticas, é possível que a indução de IL-10 e das células regulatórias pelo *S. mansoni* modulem essa resposta exacerbada. De fato, células T de camundongos NOD infectados pelo *S. mansoni* produzem IL-10 após re-estimulação *in vitro* por antígenos de *S. mansoni* (ZACCONE e cols, 2002).

A infecção pelo *S. mansoni* também atenua a lesão tecidual e as manifestações clínicas de outras doenças autoimunes, a exemplo de encefalomielite experimental autoimune, doença que se assemelha a esclerose múltipla humana (LA FLAMME e cols, 2003; SEWELL e cols, 2003), colite induzida pelo TNBS em camundongos (MOREELS e cols, 2004), artrite reumatóide “like” (ELLIOTT e cols, 2003) e psoríase em camundongo (ATOCHINA e HARN, 2006).

Um estudo realizado com células de pacientes com esclerose múltipla mostrou que antígenos do ovo de *S. mansoni* (SEA) e agonistas de TLR2 podem modular vias intracelulares para suprimir a produção de IL-12, IL-6, IL-1 e TNF por células dendríticas (DCs) e aumentar produção de TGF- $\beta$  e IL-10 por ambas DCs e células B (CORREALE e FAREZ, 2009). Portanto, esses estudos indicam que moléculas de *S. mansoni* exercem efeitos regulatórios potentes, demonstrado em estudos em modelo murino e em células de humanos nas doenças autoimunes.

## 2.7 PAPEL DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES NA IMUNOMODULAÇÃO PELO *SCHISTOSOMA MANSONI*

Antígenos de *S. mansoni* têm sido testados em modelo experimental e *in vitro* quanto à capacidade de prevenir a infecção pelo *Schistosoma* spp. e os mecanismos patogênicos induzidos por este parasito. As proteínas recombinantes Sm29 e SmTSP-2 e o antígeno bruto derivado do verme adulto (SWAP), o PIII, por exemplo, têm sido avaliados quanto ao potencial protetor na infecção pelo *S. mansoni* e na redução da patologia associada a infecção por este parasito, a exemplo da modulação do granuloma (GUSTAVSON e cols, 2002; ZOUAIN e cols, 2004; PACIFICO e cols, 2006).

Estes antígenos têm sido descritos por estarem presentes no tegumento do verme adulto do *Schistosoma* spp. e, possivelmente, estão envolvidos na supressão do sistema imune pelo parasito, favorecendo a sobrevivência do mesmo no hospedeiro. A análise de microscopia confocal mostrou que a Sm29 é expressa de forma abundante no tegumento do verme adulto e esquistossômulos e a fêmea também possui a proteína em tecidos internos do parasito (CARDOSO e cols, 2006a; 2008a). Assim como Sm29, SmTSP-2 também é encontrada no tegumento de *Schistosoma* (BRASCHI e cols, 2006; BRASCHI e WILSON, 2006).

Em modelo experimental, estudos com o antígeno PIII, têm mostrado associação deste antígeno com modulação da formação do granuloma através da indução de IL-10 (ZOUAIN e cols, 2000). Outro estudo realizado, avaliando a regulação do granuloma por esse mesmo antígeno, demonstrou diminuição da proliferação celular *in vitro*, aumento da produção de IL-10, diminuição da frequência de células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e aumento de CD8<sup>+</sup> expressando a molécula inibitória CTLA-4 (ZOUAIN e cols, 2004).

Recentemente, trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa do SIM, utilizando um modelo murino de asma, observou que a imunização com os antígenos de *S. mansoni* Sm22.6, PIII e Sm29 resultou na redução no número de células totais e eosinófilos no BAL (lavado brônquio-alveolar) e nos níveis de IgE específica para OVA (ovalbumina), comparados aos camundongos não imunizados. Adicionalmente, os níveis de IL-4 e IL-5 no BAL dos camundongos imunizados com PIII e Sm22.6 foram diminuídos, enquanto que os níveis de IL-10 foram maiores em camundongos imunizados com Sm22.6. A frequência de células TCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> foi maior no grupo de camundongos que receberam Sm22.6, Sm29 e PIII e um aumento na frequência de

células TCD4<sup>+</sup> expressando IL-10 apenas em camundongos imunizados com Sm22.6 (CARDOSO e cols, 2010). Em outro estudo, as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup> de indivíduos asmáticos não infectados, após adição dos antígenos de *S. mansoni* Sm22.6, Sm29 e PIII às culturas, foram as principais fontes de IL-10 (CARDOSO e cols, 2012). Esses resultados têm ajudado no entendimento dos mecanismos pelos quais *S. mansoni* pode interferir na resposta específica para aeroalérgenos e, apontam a IL-10 como uma citocina envolvida nestes mecanismos.

### 3. HIPÓTESE

Antígenos do *S. mansoni* rSm29, rSmTSP-2 e PIII, por induzir células e citocinas regulatórias, modificam o perfil de monócitos e o grau de ativação destas células na leishmaniose cutânea.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da adição dos antígenos de *S. mansoni* rSm29, rSmTSP-2 e PIII sobre a resposta imune induzida pelo antígeno de *Leishmania* (SLA), em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea, quanto a expressão de citocinas e moléculas de superfície pelos monócitos e linfócitos destes pacientes.

#### 4.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 e IL-5 em sobrenadante de culturas de CMSP de pacientes com LC, estimuladas com SLA, na presença ou ausência dos antígenos rSm29, rSmTSP-2 e PIII.
2. Determinar a frequência de subtipos de linfócitos (TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e Treg) e monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) nas culturas de CMSP de pacientes com LC, estimuladas com SLA na presença ou ausência dos antígenos rSm29, rSmTSP-2 e PIII.
3. Avaliar a expressão de moléculas co-estimulatórias em linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e em monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) nas culturas de CMSP de pacientes com LC, estimuladas com SLA na presença ou ausência dos antígenos rSm29, rSmTSP-2 e PIII.

## 5. RESULTADOS

Esta tese é baseada nos seguintes artigos, os quais serão referidos pelos seus numerais romanos.

- I. **Bafica AM**, Cardoso LS, Oliveira SC, Loukas A, Varela GT, Oliveira RR, BACELLAR O, Carvalho EM, Araujo MI. *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response *in vitro* during cutaneous leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 106 (7): 856-63, 2011.
  
- II. **Bafica AM**, Cardoso LS, Oliveira SC, Loukas A, Goes A, Oliveira RR, Carvalho EM, Araujo MI. Changes in T-cell and monocyte phenotypes *in vitro* by *Schistosoma mansoni* antigens in cutaneous leishmaniasis patients. **Journal of Parasitology Research.** Artigo aceito 8/10/2012.

**ARTIGO I**

Revista: Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 106(7): 856-863, Nov. 2011

*Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response *in vitro* during cutaneous leishmaniasis

Aline Michelle Barbosa Bafica<sup>1/+</sup>, Luciana Santos Cardoso<sup>1,2</sup>, Sérgio Costa Oliveira<sup>3</sup>, Alex Loukas<sup>4</sup>, Giuseppe Tittoni Varela<sup>1</sup>, Ricardo Riccio Oliveira<sup>1</sup>, Olívia Bacellar<sup>1,5</sup>, Edgar Marcelino Carvalho<sup>1,5,6</sup>, Maria Ilma Araújo<sup>1,5,6</sup>

**Antígenos de *Schistosoma mansoni* alteram a resposta de citocinas durante a leishmaniose cutânea *in vitro***

**Resumo**

Infecção por *Schistosoma mansoni* ou produtos do parasito são capazes de modular a resposta inflamatória do tipo Th1 associada às doenças autoimunes. Neste estudo, avaliamos a possibilidade de antígenos do *S. mansoni* alterar a resposta imune induzida pelo antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) em pacientes com leishmaniose cutânea (LC). As citocinas foram medidas a partir dos sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com SLA na presença ou na ausência de antígenos recombinantes do *S. mansoni* Sm29 e SmTSP-2 e do PIII. A adição dos antígenos do *S. mansoni* às culturas resultou na redução dos níveis de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) em 37-50% dos pacientes. Embora, em menor grau, os antígenos também foram capazes de diminuir a produção do fator de necrose tumoral (TNF). Nós comparamos os pacientes que tiveram ou não redução na produção de IFN- $\gamma$  e TNF em culturas estimuladas com SLA, pela presença dos antígenos do *S. mansoni*. Não houve diferença significativa no número e tamanho das lesões e nem nos níveis basais de IFN- $\gamma$  e TNF, e também não observamos diferenças entre os grupos em relação aos níveis de IL-10 e IL-5 em resposta aos antígenos do *S. mansoni*. Os antígenos utilizados no presente estudo modularam a resposta pró-inflamatória *in vitro* induzida pelo SLA em um grupo de pacientes com LC através de um mecanismo ainda não bem definido.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea. Antígenos de *S. mansoni*. rSm29. rSmTSP-2. PIII.

## *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response in vitro during cutaneous leishmaniasis

Aline Michelle Barbosa Bafica<sup>1\*</sup>, Luciana Santos Cardoso<sup>1,2</sup>, Sérgio Costa Oliveira<sup>4</sup>, Alex Loukas<sup>5</sup>, Giuseppe Tittoni Varela<sup>6</sup>, Ricardo Riccio Oliveira<sup>1</sup>, Olívia Bacellar<sup>1,4</sup>, Edgar Marcelino Carvalho<sup>1,4,4</sup>, Maria Ilma Araújo<sup>1,4,4</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Rua João das Botas s/n, 40110-160 Salvador, BA, Brazil <sup>2</sup>Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, Salvador, BA, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil <sup>4</sup>Center for Immunity, Infection and Evolution, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

<sup>5</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais <sup>6</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brazil

*Schistosoma mansoni* infection or associated products are able to down-modulate the type 1 CD4<sup>+</sup> T cell inflammatory response characteristic of autoimmune diseases. In this study, we evaluated how *S. mansoni* antigens altered the immune response that was induced by the soluble *Leishmania* antigen (SLA) from cutaneous leishmaniasis (CL) patients. Cytokines were measured from the supernatants of peripheral blood mononuclear cell cultures stimulated with SLA. This was performed using the sandwich enzyme linked immunosorbent assay technique in the presence or absence of *S. mansoni* recombinant antigens Sm29, SmTSP-2 and PIII. The addition of *S. mansoni* antigens to the cultures resulted in the reduction of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) levels in 37-50% of patients. Although to a lesser extent, the antigens were also able to decrease the production of tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ). We compared patients that either had or did not have reduction in IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production in cultures stimulated with SLA in the presence of *S. mansoni* antigens. We found that there was no significant difference in the levels of interleukin (IL)-10 and IL-3 in response to *S. mansoni* antigens between the groups. The antigens used in this study down-modulated the in vitro proinflammatory response induced by SLA in a group of CL patients through a currently undefined mechanism.

**Key words:** cutaneous leishmaniasis - *S. mansoni* antigens - Sm29 - SmTSP-2 - PIII

Leishmaniasis is an infectious disease caused by a protozoan from the genus *Leishmania* spp. It is one of the most common infectious diseases, affecting 12 million people worldwide with an incidence of 1.5 million cases per year (Desjeux 2001). Four different forms of tegumentary leishmaniasis are described: cutaneous, mucosal, diffuse and disseminated leishmaniasis. Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common clinical manifestation, characterised by one to several skin lesions in exposed areas, with an absence or small number of parasites (Jones et al. 1987, Bogdan et al. 1996).

CL is endemic in many regions of Central and South America (Jones et al. 1987). In the state of Bahia (BA), in Brazil, the number of CL cases reaches 23.4 per 100,000 inhabitants (SVS/MS 2010).

Some evidence has suggested that the immune response contributes to the tissue injury characteristic of CL. *Leishmania donovani* infection is controlled by type 1 CD4<sup>+</sup> T cell (Th1) immune response. The Th1 response is important to produce interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and activate tissue macrophages (Murray & Cartelli 1983,

Murray et al. 1983). However in the presence of a strong of a Th1 response, there is an increased production of IFN- $\gamma$  and tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ). This increased production of inflammatory cytokines leads to intense tissue damage resulting in the development of CL and mucosal leishmaniasis (Ribeiro-de-Jesus et al. 1998).

Bacellar et al. (2002) showed that mononuclear cells from mucosal leishmaniasis patients have a decreased ability to produce and to respond to interleukin (IL)-10 after restimulation with *Leishmania braziliensis* antigen in vitro. Moreover, neutralisation of IL-10 enhanced IFN- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and also increased lymphocyte proliferation in patients with CL (Rocha et al. 1999). The regulatory cytokine IL-10 seems to play a major role in modulating the inflammatory responses associated with CL development. However, this cytokine maintains latency in murine models of *Leishmania major* infection (Belkaid et al. 2001).

In recent years, studies have demonstrated that helminth infections or products from their infections have the potential to modulate Th2-immune responses that result in the pathology of allergic diseases (Araújo et al. 2000, 2004, Cooper et al. 2003). Our research group has demonstrated that asthmatic patients who are infected with *Schistosoma mansoni* have a less severe course of asthma and an inhibition of the Th2 inflammatory response that seems to be mediated by IL-10 (Medeiros et al. 2004, Cardoso et al. 2006). In a murine model of ovalbumin (OVA)-induced airway inflammation, S.

Financial support: MCT/CNPq (47941/2008 3 universal)

MIA, SCO and EMC are investigators supported by CNPq.

\* Corresponding author: alinebafica@gmail.com

Received 27 April 2011

Accepted 8 July 2011

*mansoni* antigens reduced the allergic Th2 response (Cardoso et al. 2010). Other recent experimental studies have shown that *S. mansoni* infection or parasite products induce regulatory cells and cytokines that are able to prevent an autoimmune Th1 inflammatory response seen in diseases such as type-1 diabetes, encephalomyelitis and psoriasis (Cooke et al. 1999; Sewall et al. 2003; Asochina & Harn 2006).

Considering the demonstrated ability of *S. mansoni* antigens to prevent some Th1-mediated diseases, this study aimed to evaluate the effects of *S. mansoni* antigens on the immune response induced by the soluble *Leishmania* antigen (SLA) in CL patients. We examined IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-5 production by PBMC stimulated in vitro with SLA in the presence or absence of the *S. mansoni* antigens Sm29, tetraspanin 2 (SmTSP-2) and PIII, a fraction of *S. mansoni* soluble adult worm antigen (SWAP).

#### PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

This study evaluated the ability of *S. mansoni* antigens to alter cytokine production by PBMC from patients with CL, which was assessed based on the PBMC cytokine response to SLA in vitro. The study included 22 individuals living in the endemic area of Corte de Pedra, BA. They attended the local healthcare facility from September 2009–October 2010 and agreed to participate in this study.

All patients included in the study donated blood for PBMC cultures, which were stimulated with SLA in the presence or absence of *S. mansoni* antigens.

*S. mansoni* antigens - The antigens used in this study included the recombinant proteins Sm29 and SmTSP-2 and a fraction of *S. mansoni* SWAP obtained by anionic chromatography referred to in this study as PIII. The recombinant proteins were cloned in *Escherichia coli*. They were tested for lipopolysaccharide (LPS) contamination using a commercially available Chromogenic LAL Kit (Cambrex). The levels of LPS in Sm29 and SmTSP-2 were below 0.25 ng/mL. In order to neutralize the potential effects of LPS, polymyxin B was added to the cell cultures every 12 h as previously performed (Cardoso et al. 2007).

*PBMC cultures and cytokine measurements* - PBMCs were obtained using a Ficoll-Hypaque gradient. PBMCs were cultured at a concentration of  $3 \times 10^6$  cells/mL in Roswell Park Memorial Institute 1640 containing 10% normal human serum (AB<sup>+</sup>, heat inactivated), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine and 30 mM HEPES (Life Technologies Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). Cells were cultured with the antigens Sm29, SmTSP-2 and PIII at a concentration of 5  $\mu$ g/mL in the presence or absence of SLA (5  $\mu$ g/mL). The levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-5 were measured in the supernatants of PBMC cultures as determined by sandwich enzyme linked immunosorbent assay. The results are expressed as picograms per millilitre (pg/mL) based on a standard curve.

*Statistical analyses* - Statistics were analysed utilizing the software Statistical Package for Social Science version 9.0 for Windows. Statistical differences between

the means of cytokine levels were analysed using Wilcoxon matched pairs test or Mann-Whitney test, as indicated. Fisher's exact test was used to compare proportions. Statistical significance was established at the 95% confidence interval.

The Ethical Committee of Clínicário de Oliveira Maternidade, Federal University of Bahia, approved the present study. Informed consent was obtained from all study participants or their legal guardians.

#### RESULTS

The demographic information for CL patients included in the study is shown in Table 1. A total of 22 patients with CL were enrolled in this study: 13 were male and nine were female, with a mean age of  $26.2 \pm 9.8$  years (range 6–48 years) (Table 1). The majority of patients presented with a single lesion (77.3%) and the median lesion size was 100 mm<sup>2</sup> (interquartile range, 35.0–276.0).

To test the ability of *S. mansoni* antigens, Sm29, SmTSP-2 and PIII, to down-modulate IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production, these antigens were added into SLA-stimulated PBMC cultures from CL patients. There were no significant differences between the mean levels of IFN- $\gamma$  detected in supernatants of PBMC cultures stimulated with SLA alone [mean  $\pm$  standard error (SEM) =  $3,568 \pm 1,184$  pg/mL] or SLA plus *S. mansoni* antigens rSm29, SmTSP-2 and PIII ( $3,819 \pm 1,144$  pg/mL,  $4,822 \pm 1,373$  pg/mL and  $3,466 \pm 308.5$  pg/mL, respectively) (Fig. 1A–C). Likewise, no difference was observed in levels of TNF- $\alpha$  in the supernatants of PBMC cultures stimulated with SLA alone ( $2,314 \pm 318.5$  pg/mL) and SLA plus *S. mansoni* antigens Sm29, SmTSP-2 and PIII ( $2,638 \pm 323.5$  pg/mL,  $2,314 \pm 381.5$  pg/mL and  $2,167 \pm 304.4$  pg/mL, respectively) (Fig. 1A–C).

A significant increase in the concentration of IL-10 was observed when Sm29 was added to the cultures (mean  $\pm$  SEM =  $528.8 \pm 151.8$  pg/mL) as compared to SLA alone ( $170.3 \pm 70.7$  pg/mL,  $p < 0.0005$ ). The difference in mean levels of IL-10 was not significant for the two other *S. mansoni* antigens used in this study SmTSP-2 and PIII ( $175.2 \pm 64.6$  pg/mL and  $172.6 \pm 53.4$  pg/mL, respectively) (Fig. 1D–F).

TABLE 1  
Demographic characteristics of the cutaneous leishmaniasis patients included in the study

Characteristics (n = 22)	Values
Age (years) (mean $\pm$ SD)	26.2 $\pm$ 9.8
Sex (female/male)	9/13
Lesions [n (%)]	
1	17 (77.3)
$\geq 2$	5 (22.7)
Size of lesion [median mm <sup>2</sup> (IQR)]	100 (35–276)

IQR: interquartile range; SD: standard deviation.

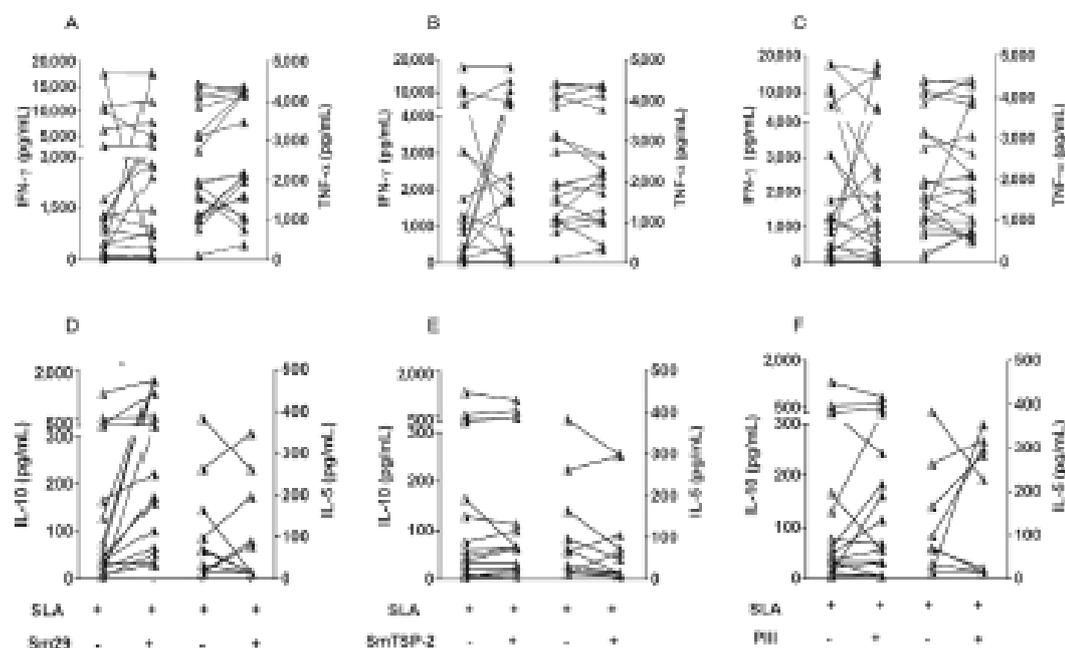


Fig. 1: levels of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in cultures stimulated with soluble *Leishmania* antigen (SLA) in the presence or absence of *Schistosoma mansoni* antigens Sm29 (A), SmTSP2 (B) and PIII (C). Levels of interleukin (IL)-10 and IL-5 in cultures stimulated with SLA in the presence or absence of *S. mansoni* antigens Sm29 (D), SmTSP-2 (E) and PIII (F). Cytokines were measured using enzyme linked immunosorbent assay sandwich technique. Asterisk means  $p < 0.0005$ . SLA vs. SLA + Sm29 (Wilcoxon matched pairs test).

Additionally, we assessed IL-5 production and found no significant differences between the mean levels of this cytokine detected in the supernatants of PBMC cultures stimulated with SLA alone (mean  $\pm$  SEM =  $66.4 \pm 23$  pg/mL) or SLA plus *S. mansoni* antigens rSm29, SmTSP-2 and PIII ( $62.5 \pm 22.3$  pg/mL,  $56.7 \pm 20.3$  pg/mL and  $89.7 \pm 29.4$  pg/mL, respectively;  $p > 0.05$ ) (Fig. 1D-F).

There was, however, a group of patients who presented with reduced levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and increased levels of IL-10 and IL-5 when Sm29, SmTSP-2 and PIII were added to the cultures stimulated with SLA. The frequency of individuals with reduced IFN- $\gamma$  production as a result of the presence of Sm29, SmTSP-2 and PIII were 40.9%, 36.8% and 50%, respectively. Reduction in TNF- $\alpha$  levels was found in 15.8%, 26.3% and 27.3% of CL patients when Sm29, SmTSP-2 and PIII were added to the PBMC cultures stimulated with SLA. The addition of Sm29, SmTSP-2 and PIII to the cultures resulted in increased levels of IL-10 in 68.4%, 52.6% and 47.4% of patients, respectively. Additionally, levels of IL-5 were increased in 21%, 15.8% and 26.3% of patients when Sm29, SmTSP-2 and PIII were added to the cultures stimulated with SLA.

Patients that showed varying levels of cytokine production following the addition of the *S. mansoni* antigens to the cultures stimulated with SLA were further analysed individually. The levels (mean  $\pm$  SEM) of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ,

IL-10 and IL-5 in the supernatants of PBMC cultures stimulated with SLA in the presence or absence of Sm29, SmTSP-2 and PIII are shown in Fig. 2. The mean levels of IFN- $\gamma$  (Fig. 2A) diminished from  $3,379 \pm 1,233$  pg/mL to  $1,093 \pm 340.3$  pg/mL (79.7% reduction) to  $1,739 \pm 920.7$  pg/mL (67.7% reduction) and to  $2,409 \pm 1,357$  pg/mL (53.3% reduction) in the presence of Sm29, SmTSP-2 and PIII, respectively, compared to SLA alone ( $p < 0.05$ ).

The levels of TNF- $\alpha$  (Fig. 2B) dropped from  $2,090 \pm 210.8$  pg/mL in PBMC cultures stimulated with SLA to  $950.9 \pm 96.1$  pg/mL (54.5% reduction),  $1,823 \pm 450.8$  pg/mL (12.7% reduction) and  $1,411 \pm 356$  pg/mL (32.5% reduction) in the presence of Sm29, SmTSP-2 and PIII, respectively. On the other hand, the levels of IL-10 (Fig. 2C) increased from  $156.6 \pm 46.9$ – $693.6 \pm 204$  pg/mL (342.9% increase after addition of Sm29), to  $195.7 \pm 77.9$  pg/mL (25% increase in response to SmTSP-2) and to  $216.7 \pm 77.9$  pg/mL (38.4% increase in response to PIII) ( $p < 0.05$ ). There was also an increase in the levels of IL-5 from  $107.4 \pm 30$ – $177.3 \pm 62.9$  pg/mL (65% increase) to  $154.7 \pm 71.2$  pg/mL (44% increase) and to  $301 \pm 16.7$  pg/mL (180% increase) when Sm29, SmTSP-2 and PIII were added to the cultures, respectively ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2D).

Correlations between the levels of the pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  with the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-5 were analysed. There was a positive correlation between the levels of TNF- $\alpha$

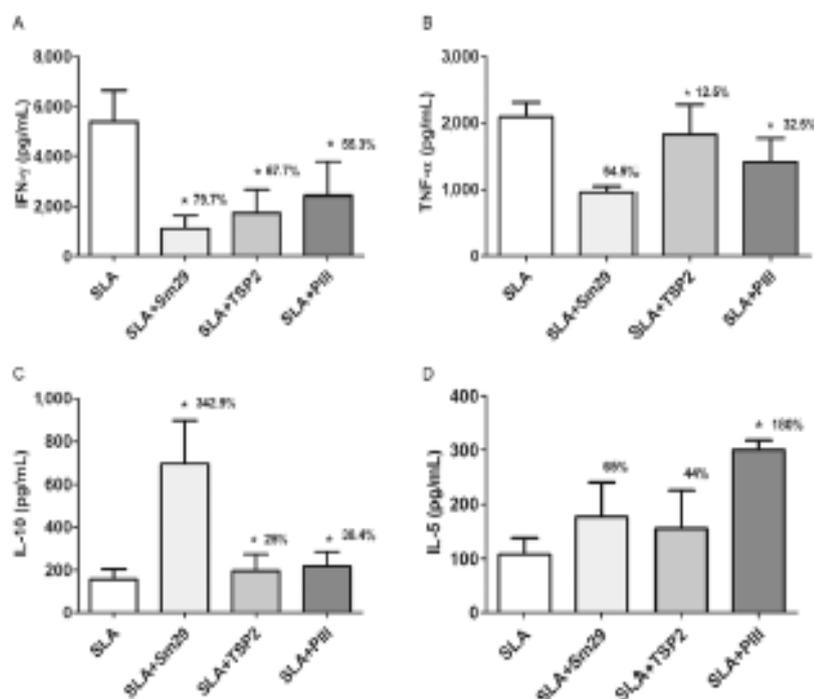


Fig. 2. Levels of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) (A), tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (B), interleukin (IL)-10 (C) and IL-5 (D) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) supernatants of cutaneous leishmaniasis patients stimulated with soluble *Leishmania* antigen (SLA) *in vitro* in the presence and absence of the *Schistosoma mansoni* antigens Sm29, SmTSP-2 and PIII. Cytokines were measured using enzyme linked immunosorbent assay sandwich technique. The figures represent the mean  $\pm$  standard deviation of cytokine levels in individuals who presented with decreased in the levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and increased levels of IL-10 and IL-5 when *S. mansoni* antigens were added to the cultures. Asterisk means  $p < 0.05$ . SLA vs. SLA + *S. mansoni* antigens (Wilcoxon matched pairs test) (the percentage of reduction is indicated next to the asterisk).

and IL-5 when Sm29 ( $r = 0.6$ ;  $p = 0.004$ ) and SmTSP2 ( $r = 0.5$ ;  $p = 0.004$ ) were added to the cultures. No significant correlation was observed between levels of IFN- $\gamma$  and IL-5 or IFN- $\gamma$  and IL-10. Additionally, there was no correlation between the levels of TNF- $\alpha$  and IL-10 when the *S. mansoni* antigens were added to the cultures (not shown).

In order to evaluate if the severity of leishmaniasis, measured by number and size of lesions, interferes with the response to *S. mansoni* antigens *in vitro*, we analysed the frequency of CL patients who presented or did not present reduction in the levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  according to these specified parameters (Tables II, III). Patients whose levels of IFN- $\gamma$  were unaffected by the addition of SmTSP-2 to the cultures had smaller lesion size compared to patients who had reduced levels of IFN- $\gamma$  ( $p < 0.05$ ) (Table II). There was no significant difference in other assessed clinical parameters, such as number of lesions and number of pentavalent antimony Sb<sup>III</sup> courses, between these two groups of patients when *S. mansoni* antigens were added to the PBMC cultures.

Additionally, patients who either had reduced levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  or not when *S. mansoni* antigens were added to the cultures were evaluated regarding the

levels of IL-10 and IL-5. Patients with reduced IFN- $\gamma$  production as a result of the addition of *S. mansoni* antigens and those patients in whom IFN- $\gamma$  production was unaffected had similar frequencies of individuals who displayed increased levels of IL-10 and IL-5 in response to *S. mansoni* antigens ( $p > 0.05$ ) (Table II).

The frequency of patients who had increased levels of IL-10 and IL-5 when the *S. mansoni* antigens were added to the cultures did not differ between the group of patients who either had a reduction in TNF- $\alpha$  production or not in the presence of *S. mansoni* antigens ( $p > 0.05$ ) (Table III).

Finally, we compared the levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in response to SLA between the group of patients who had reduced levels of these cytokines by the addition of *S. mansoni* to the cultures and those who did not have reduced cytokine production. The levels of TNF- $\alpha$  were similar between groups ( $p > 0.05$ ) (Table III). However, the levels of IFN- $\gamma$  were higher in patients who had reduced IFN- $\gamma$  production in response to PIII ( $6,046 \pm 6,925$  pg/mL) as compared to those who did not have reduced production of IFN- $\gamma$  when PIII was added to the culture ( $1,176 \pm 1,877$  pg/mL,  $p = 0.05$ ).

TABLE II  
Frequency of individuals who presented reduction in the levels of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) by the presence of *Schistosoma mansoni* antigens in culture stimulated with soluble *Leishmania* antigen (SLA) according to clinical and immunological features

	Patients who presented inhibition in IFN- $\gamma$ production			Patients who did not present inhibition in IFN- $\gamma$ production		
	Sm29	SmTSP-2	PfII	Sm29	SmTSP-2	PfII
<b>Lesions [n (%)]</b>						
1	7/9 (77.9)	5/7 (71.4)	7/11 (63.6)	10/13 (76.9)	11/12 (91.7)	9/10 (90)
$\geq 2$	2/9 (22.2)	2/7 (28.6)	4/11 (36.4)	3/13 (23.1)	1/12 (8.3)	1/10 (10)
<b>Lesions size (mm<sup>2</sup>)</b>						
0-99	4/9 (44.5)	3/7 (42.9)	7/11 (63.6)	6/13 (46.1)	11/12 (91.7) <sup>a</sup>	5/10 (50)
$\geq 100$	5/9 (55.6)	4/7 (57.1)	4/11 (36.4)	6/13 (46.1)	1/12 (8.3)	4/10 (40)
No data	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1/13 (7.7)	0 (0)	1/10 (10)
<b>Sb<sup>50</sup> courses [n (%)]</b>						
1	2/9 (22.2)	2/7 (28.6)	3/11 (27.3)	3/13 (23.1)	3/12 (25)	2/10 (20)
$\geq 2$	5/9 (55.6)	1/7 (14.3)	5/11 (45.5)	3/13 (23.1)	4/12 (33.3)	2/10 (20)
No data	7/9 (77.9)	5/7 (71.4)	7/11 (63.6)	10/13 (76.9)	11/12 (91.7)	9/10 (90)
<b>IFN-<math>\gamma</math> levels in response to SLA (pg/mL)</b>	3,766 $\pm$ 6,154	4,353 $\pm$ 4,426	6,046 $\pm$ 6,925 <sup>a</sup>	3,430 $\pm$ 5,351	3,852 $\pm$ 6,722	1,176 $\pm$ 1,877
<b>Cytokines</b>						
Increase in IL-10	5/6 (83.3)	3/7 (42.8)	4/8 (50)	8/13 (61.5)	7/12 (58.3)	4/10 (40)
Increase in IL-5	1/6 (16.7)	1/7 (14.3)	1/8 (12.5)	3/13 (23)	2/12 (16.7)	3/10 (30)

<sup>a</sup>: patients who presented inhibition of IFN- $\gamma$  production vs. patients who did not reduce the levels of this cytokine when SmTSP-2 and PfII was added to the culture ( $p < 0.05$ , Fisher's exact test); IL: interleukin; Sb<sup>50</sup>: pentavalent antimony.

TABLE III  
Frequency of individuals who presented reduction in the levels of tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) by the presence of *Schistosoma mansoni* antigens in culture stimulated with soluble *Leishmania* antigen (SLA) according to clinical and immunological features

	Patients who presented inhibition in IFN- $\alpha$ production			Patients who did not present inhibition in IFN- $\alpha$ production		
	Sm29	SmTSP-2	PfII	Sm29	SmTSP-2	PfII
<b>Lesions [n (%)]</b>						
1	3/3 (100)	4/5 (80)	4/6 (66.6)	13/16 (81.3)	12/14 (85.7)	12/16 (75)
$\geq 2$	0/3 (0)	1/5 (20)	1/6 (16.7)	3/16 (18.8)	2/14 (14.3)	2/16 (12.5)
No data	0/3 (0)	0/5 (0)	1/6 (16.7)	0/16 (0)	0/14 (0)	2/16 (12.5)
<b>Lesions size (mm<sup>2</sup>)</b>						
0-99	2/3 (66.7)	2/5 (40)	1/6 (16.7)	7/16 (43.8)	8/14 (57.1)	6/16 (37.5)
$\geq 100$	1/3 (33.3)	3/5 (60)	4/6 (66.6)	8/16 (50)	5/14 (35.7)	7/16 (43.8)
No data	0/3 (0)	0/5 (0)	1/6 (16.7)	1/16 (6.3)	1/14 (7.1)	3/16 (18.8)
<b>Sb<sup>50</sup> courses [n (%)]</b>						
1	1/3 (33.3)	3/5 (60)	1/6 (16.7)	8/16 (50)	6/14 (42.9)	3/16 (18.8)
$\geq 2$	1/3 (33.3)	2/5 (40)	2/6 (33.3)	4/16 (25)	3/14 (21.4)	7/16 (43.8)
No data	1/3 (33.3)	0/5 (0)	2/6 (33.3)	4/16 (25)	5/14 (35.7)	6/16 (37.5)
<b>TNF-<math>\alpha</math> levels in response to SLA (pg/mL)</b>	1,678 $\pm$ 188.4	2,168 $\pm$ 947.2	2,051 $\pm$ 897.8	2,433 $\pm$ 1,487	2,366 $\pm$ 1,543	2,119 $\pm$ 1,585
<b>Cytokines</b>						
Increase in IL-10	3/3 (100)	2/5 (40)	1/5 (20)	10/16 (62.5)	8/14 (57.1)	8/14 (57.1)
Increase in IL-5	0/3 (0)	1/5 (20)	0/5 (0)	4/16 (25)	2/14 (14.3)	5/14 (35.7)

patients who presented inhibition of TNF- $\alpha$  production vs. patients who did not reduce the levels of this cytokine when *S. mansoni* antigens were added to the culture ( $p > 0.05$ , Fisher's exact test); IL: interleukin; Sb<sup>50</sup>: pentavalent antimony.

## DISCUSSION

The present study evaluated the ability of *S. mansoni* antigens to down-modulate the inflammatory response to SLA in PBMC of CL patients. We showed that the addition of the *S. mansoni* antigens, Sm29, SmTSP-2 and PIII, to PBMC cultures of patients infected with *L. braziliensis* stimulated with SLA reduced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ; conversely, these cells produced increased levels of IL-10 as seen in a considerable number of patients.

There is evidence that *Schistosoma* spp infection or its products protect against the development of Th2-mediated diseases in humans and mice (Araujo et al. 2000, 2004, Medeiros et al. 2003, 2004, Pacifico et al. 2009). Moreover, in experimental studies, it has been shown that *S. mansoni* infection or its parasite products are able to down-modulate the Th1 inflammatory response that is implicated in several autoimmune diseases, such as type-1 diabetes, encephalomyelitis and psoriasis (Cooke et al. 1999, Sewell et al. 2003, Atochina & Hara 2006).

Our group has performed studies in an attempt to identify *S. mansoni* antigens with regulatory properties that may enable them to down-regulate inflammation associated with particular immune-mediated diseases. For instance, in experimental models of OVA-induced asthma, the injection of Sm22.6, PIII or Sm29 antigens resulted in a decrease in Th2-inflammatory mediators involved with disease pathology (Cardoso et al. 2010).

Mechanisms underlying this modulation appear to include regulatory pathways induced by *S. mansoni* or their products. Indeed, it has been shown that during chronic *S. mansoni* infection, innate immune cells, T cells and T regulatory cells are able to produce IL-10 (Araujo et al. 2004, Hesse et al. 2004, Oliveira et al. 2009).

It has been demonstrated that *S. mansoni* phosphatidylserine (PS) has the ability to stimulate antigen-presenting cells from naive individuals to produce IL-10 via Toll-like receptor-2 stimulation which promotes T-regulatory cell maturation (van der Kleij et al. 2002). Moreover, it has been demonstrated that the immune response to the *Schistosoma haematobium* Toll-like ligand antigen, hyc-PS, results in the production of IL-10 by cells of the innate immune system in non-infected children (van der Kleij et al. 2004). This suggests that there are molecular patterns associated with helminths that are involved in the down-regulation of the immune response.

There is evidence that an exacerbated Th1 immune response with high production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , as well as a lack of regulatory response, is associated with lesion development in CL and mucosal leishmaniasis, as reviewed by Ribeiro-de-Jesus et al. (2008). On the other hand, these cytokines are fundamental to parasite killing (Liew et al. 1990). IL-10, on the other hand, is able to control the exacerbated Th1 inflammatory response, despite data that show it could be responsible for parasite maintenance (Belkaid et al. 2001). An equilibrium immune response may be the key to a harmless host-parasite relationship.

Studies of patients with concurrent infections of *L. braziliensis* and a helminth infection have shown that these patients tend to present with smaller ulcers than

patients without helminth infections. However, the time for the lesion to heal was approximately double in co-infected patients (O'Neal et al. 2007). The authors postulate that these effects are due to a stronger Th2-immune response induced by the helminth infection, which adversely affects the Th1 immune response, which compromises host defence against *Leishmania* sp. infection. However, another study demonstrated that early introduction of anti-helminthic therapy did not improve clinical outcomes in patients co-infected with helminths and *L. braziliensis* (Newlove et al. 2011).

The antigens used in this study were selected because they are secreted by the membrane and/or tegument of the *S. mansoni* adult worm. Proteins secreted or localised on the surface of *Schistosoma* spp, which are in intimate contact with host tissues, can be more effective at triggering immunoregulatory processes (Simpson et al. 1990). Our hypothesis is that these antigens may reduce the Th1 response by a mechanism involving regulatory cells and cytokines, rather than a shift towards a Th2 immune response.

Since there is limited production of IL-10 in CL (Bacellar et al. 2002), the use of *S. mansoni* antigens capable of inducing IL-10 production should be of benefit to these patients. Our findings show that the *S. mansoni* antigens, SmTSP-2 and PIII, were able to reduce IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production. However, there was not a large increase in the levels of IL-10. These results suggest that IL-10 production is not the only mechanism involved in down-modulation of the inflammatory response to *Leishmania* infection.

Although cells from patients with CL might produce IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  to delay the infection, the modulation of these cytokines at the site of the lesion appears to be a rational strategy to limit the local exacerbated immune response.

In the conventional treatment with Sb<sup>III</sup> there is a prolonged healing time of three-four months. This treatment has serious side effects including pancreatitis, liver enzyme abnormalities and cardiac arrhythmias (Berman 1997). The association of immunomodulators, such as granulocyte/macrophage colony stimulating factor locally applied as adjuvant therapy in low doses, improves the healing of chronic ulcers (Jäschke et al. 1999). Other drugs, such as pentoxifylline, inhibit TNF- $\alpha$  synthesis and thus down-modulates the immune response when associated with antimony therapy. This results in an increased cure rate and a decreased healing time of CL and mucosal leishmaniasis (Lessa et al. 2001, Machado et al. 2007). Therefore, the combination of conventional treatment with an immunomodulatory strategy may be more efficient in preventing or diminishing the tissue damage in CL or mucosal leishmaniasis.

In this study, we observed that patients who had reduced production of IFN- $\gamma$  in the presence of the *S. mansoni* antigens, Sm29 and PIII, show no differences in clinical parameters, such as number and size of lesion. Additionally, there was no difference in the course number of antimony therapy compared to those patients who did not have reduced levels of IFN- $\gamma$ . Patients who did not have reduced IFN- $\gamma$  production in the presence

of SmTSP-2 had smaller sized lesions compared to those who had reduced IFN- $\gamma$  production in the presence of this antigen. Nevertheless, there was no significant difference in the clinical parameters when we compared patients with reduced TNF- $\alpha$  production in the presence of the *S. mansoni* antigens and those who did not have reduced TNF- $\alpha$  production.

Additionally, we compared the frequency of patients who had increased levels of IL-10 and IL-5 when *S. mansoni* antigens were added to the cultures in the groups of patients who either had reduced production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  or production was unaffected when cultured with *S. mansoni* antigens. We found no significant difference between them. These findings indicate that even though *S. mansoni* antigens are capable of inducing Th2 and T regulatory cytokine production, other regulatory mechanisms may have a role in the down-modulation of Th1-inflammatory response in CL. Alternatively, IL-10 might be essential but not sufficient to regulate IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production. This concept has been demonstrated where expression of IL-10 receptor was impaired in mucosal leishmaniasis (Faria et al. 2005). This could explain the results in our study where IL-10 did not down-regulate T cell responses in cells isolated from CL patients.

It has been shown that inhibition of IFN- $\gamma$  production tends to be greater at lower concentrations of this cytokine (Ito et al. 1999). In our study, the base levels of IFN- $\gamma$  in response to SLA were compared between the group of patients who had reduced IFN- $\gamma$  production with the addition of *S. mansoni* antigens to the cultures and those patients whose IFN- $\gamma$  production was unaffected. No significant differences were found in the mean levels of IFN- $\gamma$  in response to SLA in patients who had reduced levels of IFN- $\gamma$  with the addition of Sm29 and SmTSP-2 compared to the group who did not have reduced levels of IFN- $\gamma$ . Unexpectedly, the base levels of IFN- $\gamma$  were higher in patients who had reduced levels of IFN- $\gamma$  with the addition of PIII compared to the group who did not have reduced levels of IFN- $\gamma$ . The mean levels of TNF- $\alpha$  in response to SLA did not differ between patients based on the levels of expression of TNF- $\alpha$  that followed the addition of *S. mansoni* antigens. These data lead us to conclude that the base levels of pro-inflammatory cytokines exert little or no influence on the immune response to bystander antigens in CL.

Taken together, we have shown that the *S. mansoni* antigens Sm29, SmTSP-2 and PIII induce IL-10 and IL-5 production in CL. Additionally, these antigens are able to control the in vitro inflammatory response in patients independent of the clinical features of disease, such as number and size of lesions. Ongoing studies are being conducted to identify other regulatory mechanisms that may be involved in the down-modulation of the inflammatory response in CL.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr Alfredo Goes, for his support in the development of this work, to Michael Sundberg, for his review of the manuscript, and to Dr Luiz Henrique Guimarães, Dr Paulo Machado and Ednaldo Lago, for their assistance in the endemic area.

#### REFERENCES

- Araujo MI, Hoppe B, Medeiros M Jr, Alcantara L, Almeida MC, Schriefer A, Oliveira RR, Kruschewsky R, Figueiredo JP, Cruz AA, Carvalho EM 2004. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. *J Infect Dis* 190: 1797-1803.
- Araujo MI, Lopes AA, Medeiros M, Cruz AA, Souza-Atta L, Sole D, Carvalho EM 2000. Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Immunol* 122: 145-148.
- Atchison O, Harn D 2006. Prevention of psoriasis-like lesions development in *kn/kn* mice by helminth glycans. *Exp Dermatol* 15: 461-468.
- Bacellar O, Leasa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740.
- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL 2004. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* 194: 1497-1506.
- Berman JD 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 24: 684-703.
- Bogdan C, Gomez A, Solbach W, Rollinghoff M 1996. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol* 8: 517-525.
- Cardoso LS, Araujo MI, Goes AM, Pacifico LG, Oliveira RR, Oliveira SC 2007. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Atheroscler Cell Fact* 6: 1.
- Cardoso LS, Oliveira SC, Goes AM, Oliveira RR, Pacifico LG, Marinho FV, Fonseca CT, Cardoso FC, Carvalho EM, Araujo MI 2000. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *Clin Exp Immunol* 100: 266-274.
- Cardoso LS, Oliveira SC, Pacifico LG, Goes AM, Oliveira RR, Fonseca CT, Carvalho EM, Araujo MI 2006. *Schistosoma mansoni* antigen-driven interleukin-10 production in infected asthmatic individuals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. 1): 339-343.
- Cooke A, Tonks P, Jones FM, O'Shea H, Hutchings P, Fulford AJ, Dunne DW 1998. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol* 20: 169-176.
- Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordóñez M, Strachan D, Griffin GE, Nutman TB 2003. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J Allergy Clin Immunol* 111: 995-1000.
- Dejeux P 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 239-243.
- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Leasa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO 2005. Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 73: 7833-7839.
- Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufert J, Mentink-Kane M, Loussik M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA 2004. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* 172: 3157-3166.

- Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP, Larner AC, Finbloom DS 1999. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* 93: 1456-1463.
- Jockhe E, Zeherrig A, Guttringer C 1999. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied locally in low doses enhances healing and prevents recurrence of chronic venous ulcers. *Int J Dermatol* 38: 380-386.
- Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Rond SO, Netto EM, Tada MS, Franca TF, Wise K, Orligthy, Filrig F, Costa JML, Cuba CC, Menden PD 1983. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis* 156: 73-83.
- Leao HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guareiro J, Carvalho EM 2001. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 65: 87-89.
- Liew FY, Li Y, Millott S 1990. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145: 4305-4310.
- Machado PR, Leao H, Leao M, Guimaraes LH, Bang H, Ho JL, Carvalho EM 2007. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 44: 788-793.
- Medeiros M Jr, Almeida MC, Figueiredo JP, Atta AM, Mendes CM, Araujo MI, Taketomi EA, Terra SA, Silva DA, Carvalho EM 2004. Low frequency of positive skin tests in asthmatic patients infected with *Schistosoma mansoni* exposed to high levels of mite allergens. *Pediatr Allergy Immunol* 15: 142-147.
- Medeiros M Jr, Figueiredo JP, Almeida MC, Mattos MA, Araujo MI, Cruz AA, Atta AM, Rejo MA, de Jesus AR, Taketomi EA, Carvalho EM 2005. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111: 947-950.
- Murray HW, Castell DM 1983. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J Clin Invest* 72: 32-44.
- Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD 1983. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *J Clin Invest* 72: 1506-1510.
- Newkome T, Guimaraes LH, Morgan DJ, Alcantara I, Glesby MJ, Carvalho EM, Machado PR 2011. Antihelminthic therapy and antimony in cutaneous leishmaniasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients co-infected with helminths and *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 84: 551-555.
- Oliveira RR, Collob KJ, Figueiredo JP, Alcantara LM, Cardoso LS, Aquino CS, Campos RA, Almeida MC, Carvalho EM, Araujo MI 2009. *Schistosoma mansoni* infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. *Aerobes Infect* 11: 223-229.
- O'Neil SE, Guimaraes LH, Machado PR, Alcantara I, Morgan DJ, Passos S, Glesby MJ, Carvalho EM 2007. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis cutaneous leishmaniasis*. *J Infect Dis* 195: 142-148.
- Pacifico LO, Marinho FA, Fonseca CT, Barante MM, Pinho V, Sales-Junior PA, Cardoso LS, Araujo MI, Carvalho EM, Casali GD, Tenreiro MM, Oliveira SC 2009. *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells independent of interleukin-10. *Infect Immun* 77: 98-107.
- Ribeiro-de-Jesus A, Luna T, Pacheco de Almeida R, Machado PR, Carvalho EM 2008. Pentoxifylline down modulate in vitro T cell responses and attenuate pathology in *Leishmania* and HTLV-I infections. *Int Immunopharmacol* 8: 1344-1351.
- Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Leao H, Bacellar O, Carvalho EM 1998. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 31: 143-148.
- Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC, Baral A, Coffman RL, Carvalho EM 1999. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 180: 1731-1734.
- Sewell D, Qrig Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sander M, Fahey Z 2003. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *Int Immunol* 15: 59-69.
- Simpson AJ, Hagan P, Hackett F, Omer Ali P, Smithers SR 1990. Epitopes expressed on very low Mr *Schistosoma mansoni* adult tegumental antigens conform to a general pattern of life-cycle cross-reactivity. *Parasitology* 100: 73-80.
- van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruijer YC, Schmitz M, Karst-Jones EA, Espevik T, de Jong EC, Kapteinberg ML, Golenbock DT, Tiedens AG, Yazdanbakhsh M 2002. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 277: 48122-48129.
- van der Kleij D, van den Biggelaar AH, Kruijer YC, Retra K, Fülle Y, Schmitz M, Krommer PG, Tiedens AG, Yazdanbakhsh M 2004. Responses to Toll-like receptor ligands in children living in areas where schistosome infections are endemic. *J Infect Dis* 189: 1044-1051.

## ARTIGO II

Revista: Journal of parasitology research. October, 2012.

Changes in T-cell and monocyte phenotypes *in vitro* by *Schistosoma mansoni* antigens in cutaneous leishmaniasis patients

Aline Báfica<sup>1</sup>, Luciana Santos Cardoso<sup>1,2</sup>, Sérgio Costa<sup>3,5</sup>, Alex Loukas<sup>4</sup>, Alfredo Miranda Goes<sup>3</sup>, Ricardo Riccio Oliveira<sup>1</sup>, Edgar M. Carvalho<sup>1,5,6</sup> e Maria Ilma Araujo<sup>1,5,6</sup>

### **Mudança no fenótipo de células T e monócito *in vitro* por antígenos de *Schistosoma mansoni* em pacientes com leishmaniose cutânea**

Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$  e TNF, são associados a lesões teciduais na leishmaniose cutânea (LC). Nós previamente demonstramos que antígenos de *Schistosoma mansoni* modulam a resposta de citocinas na LC *in vitro*. No atual estudo, avaliamos se os antígenos de *S. mansoni* alteram o fenótipo de monócitos e linfócitos T na leishmaniose cutânea. As células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LC foram cultivadas com antígeno de *L. braziliensis* na presença ou ausência dos antígenos de *S. mansoni* rSm29, rSmTSP-2 e PIII. As células foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. A adição de rSm29 às culturas diminuiu a expressão de HLA-DR em monócitos não-clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>), ao passo que a adição de PIII diminuiu a expressão desta molécula em monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) e intermediários (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>). A adição de PIII e rSmTSP-2 resultou na modulação da expressão de CD80 em monócitos não-clássicos e de CD86 em monócitos intermediários, respectivamente. Estes dois antígenos aumentaram a expressão de CTLA-4 em células T CD4<sup>+</sup> e também expandiram a frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3. Esses dados juntos mostram que os antígenos de *S. mansoni*, principalmente PIII e rSmTSP-2 são capazes de diminuir o estado de ativação dos monócitos e também aumentam a expressão de moléculas moduladoras em linfócitos T.

Palavras-chave: Antígenos de *S. Mansoni*. Leishmaniose. Células Treg. Monócitos.

## Clinical Study

# Changes in T-Cell and Monocyte Phenotypes *In Vitro* by *Schistosoma mansoni* Antigens in Cutaneous Leishmaniasis Patients

Aline Michelle Barbosa Bafica,<sup>1</sup> Luciana Santos Cardoso,<sup>1,2</sup>  
 Sérgio Costa Oliveira,<sup>3,4</sup> Alex Loukas,<sup>5</sup> Alfredo Góes,<sup>3</sup> Ricardo Riccio Oliveira,<sup>1</sup>  
 Edgar M. Carvalho,<sup>1,4,6</sup> and Maria Ilma Araujo<sup>1,4,6</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, 5 Rua João das Botas s/n, Caixa, 40110-160 Salvador, BA, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, 2555 Rua Silveira Martins, Caixa, 41.150-000 Salvador, BA, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Biotecnologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 6627 Avenida Antônio Carlos, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT-CNPQ/MCT), Rua João das Botas s/n, Caixa, 40110-160 Salvador, BA, Brazil

<sup>5</sup> Queensland Tropical Health Alliance and School of Public Health and Tropical Medicine, James Cook University, Cairns, QLD 4878, Australia

<sup>6</sup> Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, No. 275 Avenida Dom João VI, Brotas, 40290-000 Salvador, BA, Brazil

Correspondence should be addressed to Aline Michelle Barbosa Bafica, alinebafica@gmail.com

Received 13 July 2012; Revised 24 September 2012; Accepted 8 October 2012

Academic Editor: Andrea Teixeira-Carvalho

Copyright © 2012 Aline Michelle Barbosa Bafica et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

High levels of proinflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF are associated with tissue lesions in cutaneous leishmaniasis (CL). We previously demonstrated that *Schistosoma mansoni* antigens downmodulate the *in vitro* cytokine response in CL. In the current study we evaluated whether *S. mansoni* antigens alter monocyte and T-lymphocyte phenotypes in leishmaniasis. Peripheral blood mononuclear cells of CL patients were cultured with *L. braziliensis* antigen in the presence or absence of the *S. mansoni* antigens rSm29, rSmTSP-2, and PIII. Cells were stained with fluorochrome conjugated antibodies and analyzed by flow cytometry. The addition of rSm29 to the cultures decreased the expression of HLA-DR in nonclassical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) monocytes, while the addition of PIII diminished the expression of this molecule in classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) and intermediate (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) monocytes. The addition of PIII and rSmTSP-2 resulted in downmodulation of CD80 expression in nonclassical and CD86 expression in intermediate monocytes, respectively. These two antigens increased the expression of CTLA-4 in CD4<sup>+</sup> T cells and they also expanded the frequency of CD4<sup>+</sup>CD137<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells. Taken together, we show that *S. mansoni* antigens, mainly rSmTSP-2 and PIII, are able to decrease the activation status of monocytes and also to upregulate the expression of modulatory molecules in T lymphocytes.

## 1. Introduction

American tegumentary leishmaniasis is a disease caused by parasites of the genus *Leishmania*. This disease represents a significant public health problem worldwide with an incidence of 1.5 million new cases in recent years [1].

Tegumentary leishmaniasis presents with a wide spectrum of clinical manifestations ranging from localized skin to widespread mucocutaneous lesions depending on the parasite species [2] and the host immune response [3, 4]. T cell-mediated immunity is crucial to host protection against *Leishmania* sp. infection; however skin and mucosal lesions

occurs due to a deregulated T helper 1 (Th1) cell response with high production of proinflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF [3, 4].

Experimental studies have shown that *Schistosoma mansoni* infection or parasite products, by inducing regulatory cells and cytokines, are able to prevent some Th1-mediated autoimmune diseases in mice such as type I diabetes, experimental autoimmune encephalomyelitis, and psoriasis [5–7]. Recently, we demonstrated that the recombinant *S. mansoni* antigens Sm29, SmTSP-2, and also PIII downmodulated the production of IFN- $\gamma$  and TNF in a group of cutaneous leishmaniasis (CL) patients [8]. In the present study, these antigens were tested regarding their ability to alter the monocyte and lymphocyte profiles. Studies have shown that Sm29 and SmTSP-2 antigens are secreted by the membrane and/or tegument of the *S. mansoni* adult worm. Proteins secreted or localized on the surface of *Schistosoma* spp., which are in intimate contact with host tissues, might be more effective in triggering immunoregulatory processes [9]. The Sm29 is a membrane-bound glycoprotein located on the tegument of the adult worm and lung stage schistosomula [10]. SmTSP-2 is a recombinant protein (tetraspanin) from *S. mansoni* tegument. In a mice model, immunization with SmTSP-2 resulted in a 57% reduction in adult worm burdens and a 64% reduction in liver egg burdens compared with control animals [11]. PIII is a multivalent antigen obtained from *S. mansoni* adult worms that modulates granuloma size in mice infected with the parasite [12, 13]. These antigens have been evaluated by our group regarding their potential to induce IL-10 production and suppress Th2 response *in vitro* in cells of asthmatic individuals [14].

Together with the Th1 immune response, monocytes and macrophage are key cells in controlling *Leishmania* sp. infection. Monocytes have been classifying into different subpopulations in mice models and also in humans. A new nomenclature was recently published defining human monocytes into three subtypes. The major population of human monocytes (90%) presents high expression of CD14 and lack of expression of CD16 (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>). They are referred to as classical monocytes. Intermediate monocytes are those which express CD14 and low CD16 expression (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), while the nonclassical monocytes express CD16 and relatively low CD14 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) [15]. In a study conducted by Wong et al. [16] the characteristics of classical, intermediate and, nonclassical monocytes were evaluated through the gene expression profiling. They observed that classical monocytes express genes involved in angiogenesis, wound healing, and coagulation, being involved in tissue repair functions in addition to high expression of proinflammatory genes [16]; intermediate monocytes highly express MHC class II indicating they have antigen presenting cell function and T cell stimulatory properties. Nonclassical monocytes express genes involved in cytoskeleton rearrangement, which may be responsible for its high motility observed *in vivo* [17].

A high frequency of CD16<sup>+</sup> monocyte subsets have been demonstrated in *Mycobacterium tuberculosis* infection and in viral infections such as hepatitis B (HBV) [18], hepatitis C (HCV) [19], HIV [20], and Dengue [21]. In

CL patients, the frequency of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes was significantly higher compared to healthy controls and they were positively correlated with the lesion size [22]. This subtype of monocytes is considered as antigen presenting cell [16], which produces cytokines and might be the most important subtype in activating T cells response.

The activation of T cells requires the antigen recognition in the MHC context and also signaling given by co-stimulatory molecules which interact with corresponding ligands on antigen presenting cells (APC). One of the most important co-stimulatory molecules on T cells is CD28, which is constitutively expressed and binds to CD80 and CD86 on the APC. CD86 is constitutively expressed at low levels and it is rapidly upregulated after primary antigen recognition, whereas CD80 exhibits delayed expression kinetics [23]. Other ligand for CD80 and CD86 is CTLA-4. The expression of this molecule is rapidly upregulated after T cell activation and provides a negative signal limiting the immune response [24–26]. *In vitro* study has shown that the addition of CTLA-4-Ig to block CD28-B7 interaction in CL patients PBMC cultures stimulated with *Leishmania* antigen led to a downmodulation of IFN- $\gamma$  and TNF secretion [27]. Other similar study showed that blocking the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 in human macrophages from *Leishmania*-naïve donors infected with *L. major* resulted in a significant reduction in IFN- $\gamma$ , IL-5, and IL-12 production [28].

In this study we evaluated whether *S. mansoni* antigens alter the expression of CD80 and CD86 on monocytes of CL patients and also the expression of CTLA-4 in T lymphocytes. Additionally, we assessed the frequency of regulatory T cells induced by *S. mansoni* antigens when they were added to the cell cultures stimulated with *Leishmania* antigens.

The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells have been extensively studied due to their critical function in maintaining self-tolerance. These cells can express both low and high CD25 levels in mice models; however, only the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> population exhibits a strong regulatory function in humans. These CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells also express FOXP3, a molecule associated with regulatory functions [29]. This T cell subset in humans comprises ~1.5–3% of circulating CD4<sup>+</sup> T cells. They inhibit proliferation and cytokine secretion induced by TCR cross-linking of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T cells in a contact-dependent manner [30] and completely abrogate IL-2-dependent proliferation of NK cells [31]. Moreover, regulatory T cells are able to downregulate the intensity and duration of both Th1 and Th2 immune responses in infectious diseases limiting damage to self-tissue [32, 33].

Our hypothesis in the present study is that the pathology of cutaneous leishmaniasis results from monocyte and T cell hypersensitivity due to impaired regulatory mechanisms. In this context, the use of *S. mansoni* antigens which induce regulatory cells and molecules would prevent the inflammatory process. To test this hypothesis we evaluated whether the addition of *S. mansoni* antigens to cell cultures of leishmaniasis patients would modify the phenotype and activation status of monocytes and lymphocytes. Specifically, we evaluated the expression of HLA-DR, CD80, and CD86 on classical, intermediate, and nonclassical monocytes and

CD28, CTLA-4, CD25, and Foxp3 in T lymphocytes from CL patients in response to the soluble *Leishmania braziliensis* antigen (SLA) in the presence or absence of the *S. mansoni* antigens rSm29, rSmTSP-2, and PIII.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Patients and the Endemic Area.** The study included the first 30 cutaneous leishmaniasis patients living in the endemic area of tegumentary leishmaniasis, Corte de Pedra, Bahia, Brazil, who attended the local Health Post from March 2010 to March 2012 and agreed to participate. Corte de Pedra is located in the southeast region of the State of Bahia, Brazil which is well known for its high rate of *L. braziliensis* transmission.

The diagnosis of cutaneous leishmaniasis was made considering a clinical picture characteristic of CL, parasite isolation or a positive delayed-type hypersensitivity (DTH) response to *Leishmania* antigen, and a histological feature of CL.

The inclusion criteria to this study were patients with 5 to 60 years of age diagnosis of CL with the presence of active skin lesions. The exclusion criteria were pregnancy, chronic diseases such as diabetes and asthma, and also HIV and HTLV-1 infection.

Immunological analyses were performed prior to the specific therapy to leishmaniasis for all patients. There were not enough cells to perform the whole experiment every time since they require a larger number of cells more than what could be obtained from some patients.

The frequency of helminth infection in the leishmaniasis endemic area of Corte de Pedra is 88.3% and *S. mansoni* infection presents in 16.7% of cutaneous leishmaniasis patients.

The Ethical Committee of the Maternidade Clémirto de Oliveira, Federal University of Bahia approved the present study, and an informed consent was obtained from all participants or their legal guardians.

**2.2. Antigen Preparation.** The soluble *Leishmania* antigen used in this study was obtained from a *Leishmania* lysate (crude antigen). It was prepared from a *L. braziliensis* strain (MHOM/BR/2001) as previously described [34].

The *S. mansoni* antigens used in this study included Sm29, a *Schistosoma mansoni* recombinant protein [10]; SmTSP-2, a recombinant protein (tetraspanin) from *S. mansoni*/tegument [11]; a fraction of *S. mansoni* soluble adult worm antigen (SWAP) obtained by anionic chromatography (FPLC), called PIII. The Sm29 was cloned in *E. coli* and tested for lipopolysaccharide (LPS) contamination using a commercially available LAL Chromogenic Kit (CAMPBEX). The levels of LPS in Sm29 were below 0.25 ng/mL. However in order to neutralize potential effects of LPS presented in low levels in the *S. mansoni* recombinant antigen, Polymyxin B was added to cell cultures every 12 hours according to the established protocol [35]. The SmTSP-2 used in this study was produced in *Pichia pastoris* fermentation cultures and it has been kindly provided by Dr. Alex Loukas

[11, 36]. The proteins rSm29 and PIII were provided by the Institute of Biological Science, Department of Biochemistry and Immunology, UPMG, Brazil.

**2.3. Cell Culture and Intracellular and Surface Staining.** Intracellular and surface molecules were evaluated by flow cytometry (FACSort, BD Biosciences, San Jose, CA). In order to perform the intracellular staining, peripheral blood mononuclear cells (PBMC,  $3 \times 10^6$ ) obtained through the Ficoll-Hypaque gradient were cultured *in vitro* with SLA (5 µg/mL) in the presence or absence of the recombinant *S. mansoni* antigens Sm29, SmTSP-2, and PIII (5 µg/mL) for 20 h, 37°C, and 5% of CO<sub>2</sub>. During the last 4 h of culture, Brefeldin A (10 µg/mL; Sigma, St. Louis, MO), which impairs protein secretion by the Golgi complex, was added to the cultures. Afterwards, the cells were washed in PBS and fixed in 4% formaldehyde for 20 min at room temperature. Specific staining was performed with cytochrome (CY)-labeled antibody conjugated with anti-CTLA-4 mAbs in saponin buffer (PBS, supplemented with 0.5% BSA and 0.5% saponin) and phycoerythrin (PE)-labeled antibody conjugated with anti-Foxp3 in Foxp3 staining buffer set (eBioscience). For double or triple staining, mAbs to human CD4, CD8, and/or CD25 conjugated with FITC or CY were used.

The evaluation of co-stimulatory molecule expression was performed in PBMCs stimulated for 60 h with the same antigens aforementioned. Cells were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-, PE-, or CY-labeled antibody solutions for 20 min at 4°C in a volume of 20 µL in PBS. After staining, preparations were washed with 0.1% sodium azide PBS, fixed with 200 µL of 4% formaldehyde in PBS and kept at 4°C. The antibodies used for the staining were immunoglobulin isotype controls-FITC, PE and CY, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD25-FITC, anti-CD14-FITC, CD16-CY, anti-CD4-CY and anti-CD8-CY, anti-CD80-PE, anti-CD86-PE, anti-HLA-DR-PE, anti-CD28-PE (all from BD Biosciences Pharmingen). A total of 50,000 and 100,000 events were acquired for surface and intracellular experiments, respectively.

**2.4. Analysis of FACS Data.** The frequency of positive cells was analyzed by flow cytometry using the program flowjo in two regions. The lymphocyte region was determined using granularity (SSC) × size (FSC) plot. Monocytes were selected based on their granularity and expression of CD14 and CD16. Limits for the quadrant markers were always set based on negative populations and isotype controls. A representative density graph of one experiment showing lymphocyte and monocyte regions is shown in Figures 1(a) and 1(b), respectively.

**2.5. Statistical Analyses.** Statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). The frequency of positive cells was expressed as percentages and the intensity of expression as mean intensity fluorescence (MFI). The differences between means

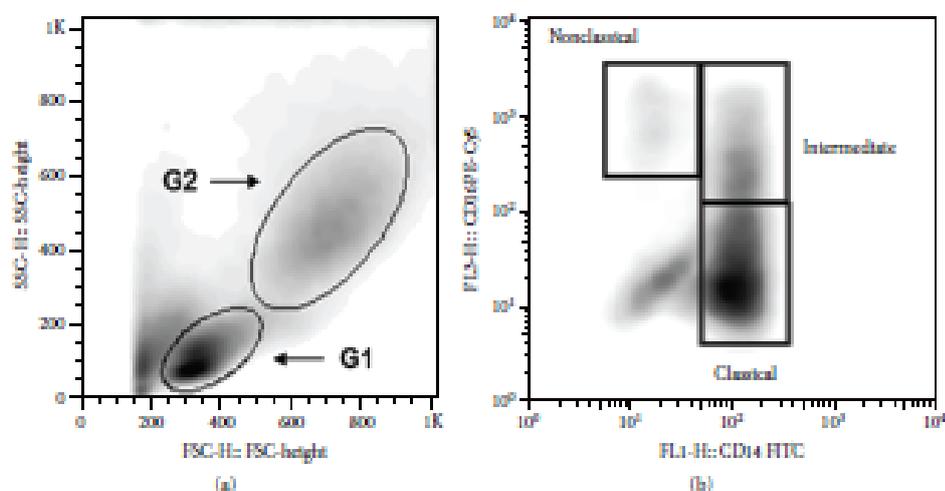


FIGURE 1: Strategy for T cell and monocytes evaluation by flow cytometry. The cell populations were defined by nonspecific fluorescence from the forward (FSC) and side scatter (SSC) as parameters of cell size and granularity, respectively. Lymphocytes region was determined using SSC  $\times$  FSC plot (G1) and monocytes region (G2) were selected based on their granularity and expression of CD14 (a). (b) represents the strategy for monocytes subsets classification through the expression of CD14 and CD16. Representative graph of one experiment.

TABLE 1: Demographic characteristics of the cutaneous leishmaniasis patients included in the study.

Characteristics (n = 30)	Values
Age, mean $\pm$ SD, years	29.1 $\pm$ 11.8
Sex, female/male	13/17
N <sup>o</sup> of lesion	
1, no. (%)	24 (80.0)
$\geq$ 2, no. (%)	06 (20.0)
Size of lesion, median mm <sup>2</sup> (IQR)	130 (66.5–342)

IQR: interquartile range; SD: standard deviation.

were assessed using Wilcoxon matched pairs test. Statistical significance was established at the 95% confidence interval.

### 3. Results

A total of 30 patients with cutaneous leishmaniasis were enrolled in this study, 17 were male and 13 were female, with a mean age of 29.1  $\pm$  11.8 years (range 6–48 years). The majority of patients presented with a single lesion (80%) and the median lesions size was 130 mm<sup>2</sup> (IQR, 66.5–342; Table 1).

**3.1. The Effect of the Addition of *S. mansoni* Antigens on Monocyte Phenotype and Expression of Co-Stimulatory Molecules.** We evaluated the frequency of different monocyte subsets (classical, intermediate, and nonclassical) and also the expression of co-stimulatory molecules in these monocytes after *in vitro* stimulation with SLA in the presence or absence of *S. mansoni* antigens. The addition of the antigens

rSm29 and PIII to the cultures expanded the frequency of nonclassical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) (mean  $\pm$  SEM = 7.4  $\pm$  1.2% and 8.1  $\pm$  1.9%, resp.) compared to cultures stimulated with SLA alone (5.7  $\pm$  0.9%;  $P < 0.05$ , Figure 2(A)). We also observed that the frequency of classical monocytes was higher in cultures without *S. mansoni* antigens (Figure 2(A)). Moreover, in the presence of PIII there was a reduction in the expression of HLA-DR in classical (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) and intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) monocytes (496  $\pm$  72 MFI and 544  $\pm$  78.6 MFI, resp.) compared to cultures stimulated with SLA alone (611  $\pm$  91 MFI and 771  $\pm$  128 MFI, respectively;  $P < 0.05$ , Figure 2(B)). There was also a reduction in HLA-DR expression on CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocytes in the presence of rSm29 (547  $\pm$  140.5 MFI) in comparison to SLA alone (718  $\pm$  188.4 MFI;  $P < 0.05$ , Figure 2(B)). Additionally, the expression of HLA-DR was higher in classical and intermediate monocytes in the presence of SLA or SLA plus *S. mansoni* antigens compared to nonstimulated cultures.

The expression of CD80 was also reduced in nonclassical monocytes compared to cultures stimulated with SLA. The addition of PIII to the cultures also resulted in reduced expression of the co-stimulatory molecule CD80 on nonclassical monocytes (61.2  $\pm$  19.5 MFI) compared to cultures without *S. mansoni* antigens (82.3  $\pm$  23.3 MFI;  $P < 0.05$ , Figure 2(C)). Also a decrease in the expression of CD86 on intermediate monocytes from 562  $\pm$  149.7 MFI to 447.8  $\pm$  112.5 MFI was observed when rSmTSP-2 was added to the cultures ( $P < 0.05$ ; Figure 2(D)). There was no significant difference in the levels of CD86 expression on monocytes in culture stimulated with SLA after the addition of rSm29 and PIII (Figure 2(D)).

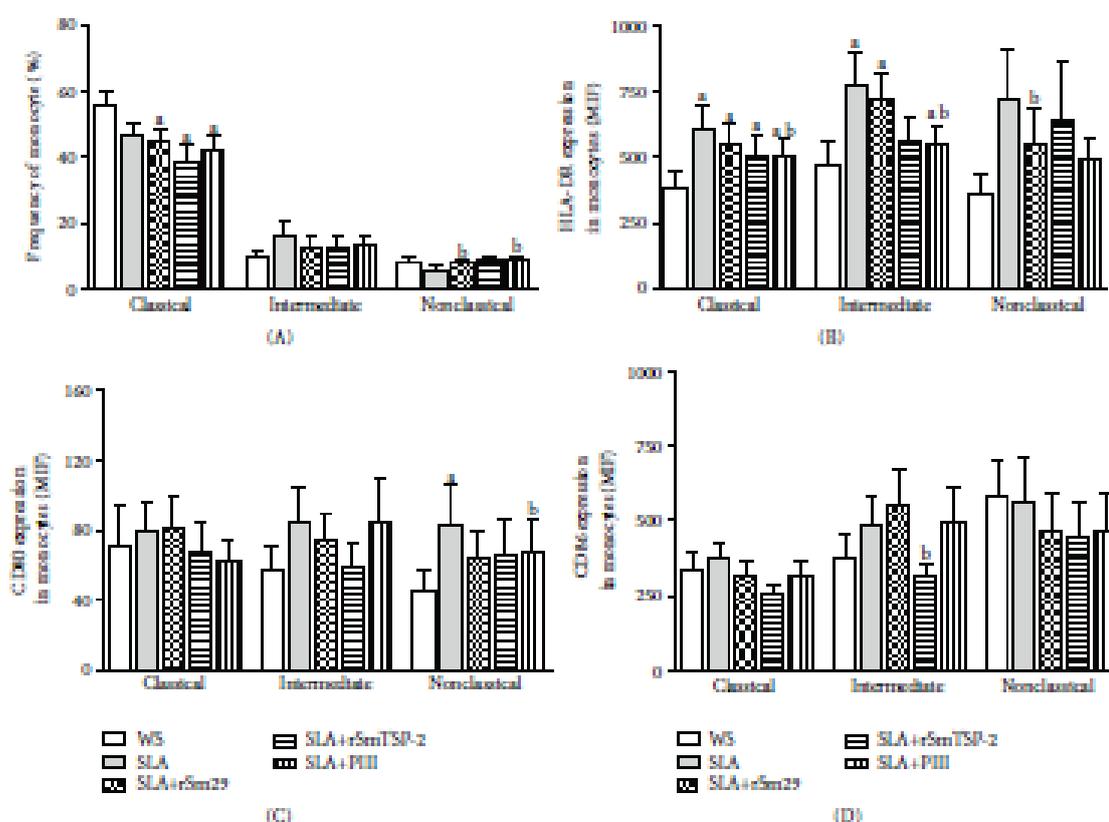


FIGURE 2: Subsets of monocytes and co-stimulatory molecules expression in monocytes of CL patients ( $n = 18$ ) stimulated *in vitro* with SLA in the presence or absence of *S. mansoni* antigens rSm29 and rSmTSP-2 or with a fraction of *S. mansoni* soluble adult worm antigen (SWAP) Pili. Frequency of classical ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), intermediate ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) and nonclassical ( $CD14^{-}CD16^{++}$ ), monocytes (A), and expression of HLA-DR, CD80, and CD86 in classical, intermediate and nonclassical monocytes of cutaneous leishmaniasis patients (B–D). Cells were stained for surface expression of CD14, CD16, HLA-DR, CD80, and CD86 using flow cytometry. <sup>a</sup> $P < 0.05$  cultures without stimulation (WS) versus SLA + *S. mansoni* antigens; <sup>b</sup> $P < 0.05$  SLA versus SLA + *S. mansoni* antigens (Wilcoxon matched pairs test).

**3.2. The Effect of the Addition of *S. mansoni* Antigens on T Cell Phenotype and Expression of Co-Stimulatory Molecules.** PBMC of CL patients were incubated with SLA in the presence or absence of *S. mansoni* antigens and the phenotype of T cells were evaluated. The addition of rSm29 antigen to the cultures increased the frequency of  $CD4^{+}$  T cells (mean  $\pm$  SEM =  $40.8 \pm 2.8\%$ ) in comparison to cultures with SLA alone ( $34.8 \pm 2.8\%$ ,  $P < 0.05$ ; Figure 3(A)). There was no significant difference in the frequency of  $CD4^{+}$  T cells after the addition of rSmTSP-2 or Pili antigens to the cultures ( $37.8 \pm 2.7\%$  and  $35.8 \pm 2.6\%$ , resp.) compared to SLA alone ( $34.8 \pm 2.8\%$ ; Figure 3(A)). Likewise, there was no significant variation in the frequency of  $CD8^{+}$  T cells by the presence of rSm29, rSmTSP-2, and Pili antigens ( $5.9 \pm 1.2\%$ ,  $4.6 \pm 0.8\%$ , and  $6.2 \pm 1.1\%$ , resp.) to the cultures in relation to the cultures stimulated with SLA without *S. mansoni* antigens ( $5.7 \pm 1.2\%$ ; Figure 3(A)). The frequency of  $CD4^{+}$  T cells was diminished by the presence of SLA and SLA plus rSmTSP-2 or Pili, while the frequency of  $CD8^{+}$  T cells was higher in

the presence of SLA and SLA plus *S. mansoni* antigens compared to nonstimulated cultures (Figure 3(A)).

We also evaluated the expression of  $CD28^{+}$  on lymphocytes in cultures stimulated with SLA with or without the addition of *S. mansoni* antigens. The expression of  $CD28^{+}$  on  $CD8^{+}$  T cells was higher in cultures stimulated with rSm29 ( $91 \pm 14$  MFI, resp.) compared with SLA alone ( $84 \pm 14$  MFI;  $P < 0.05$ , Figure 3(B)). The addition of rSmTSP-2 and Pili antigens to the cultures did not alter significantly the expression of  $CD28$  on  $CD4^{+}$  and  $CD8^{+}$  T cells (Figure 3(B)).

Regarding the expression of CTLA-4, rSmTSP-2 and Pili antigens were able to increase the expression of this molecule in  $CD4^{+}$  T cells ( $58 \pm 5$  MFI and  $53 \pm 4.6$  MFI, resp.) in comparison with SLA alone ( $49.6 \pm 4$  MFI, respectively;  $P < 0.05$ , Figure 3(C)). The expression of CTLA-4 was also higher in  $CD4^{+}$  T cells and  $CD8^{+}$  T cells in cultures stimulated with SLA plus rSmTSP-2 or Pili compared to nonstimulated cultures (Figure 3(C)). Moreover, the addition of rSmTSP-2 and Pili antigens to the cultures expanded the frequency of

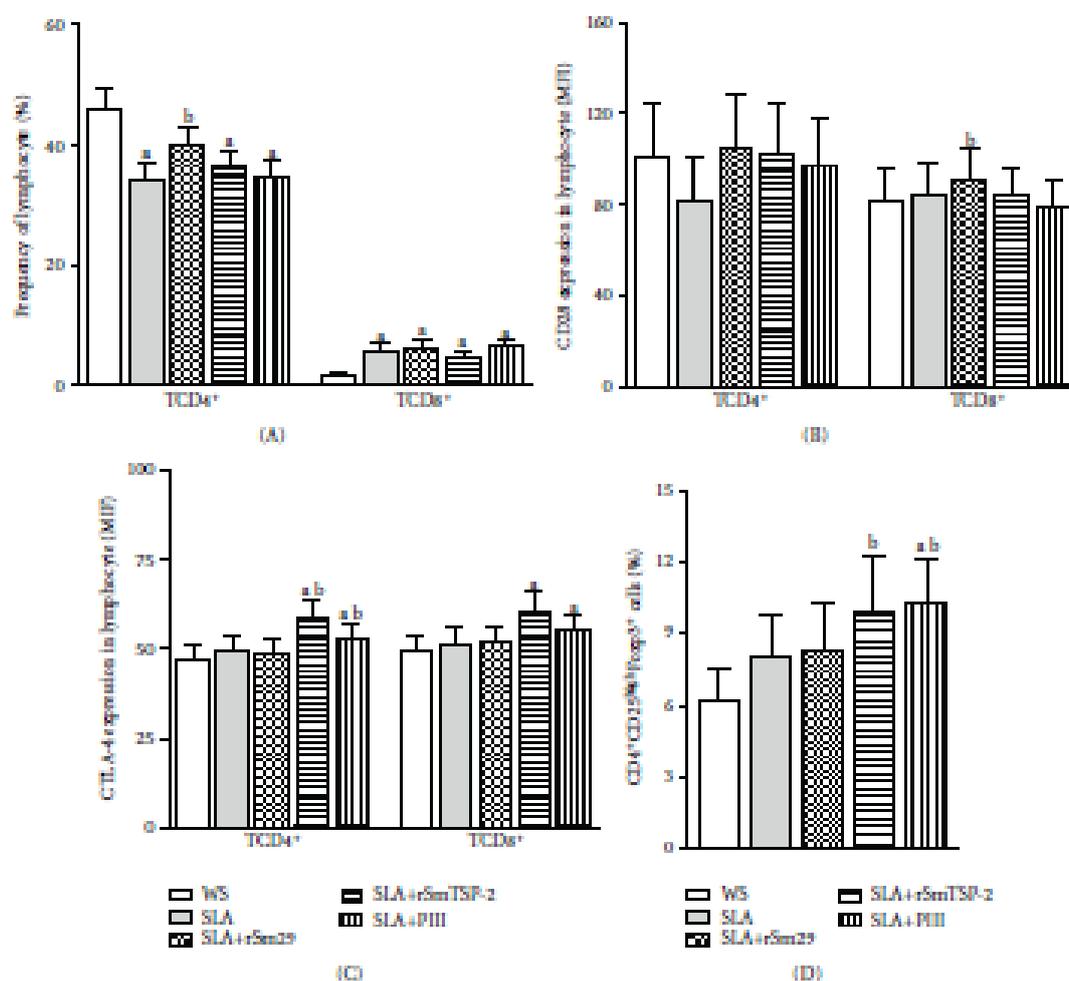


FIGURE 3: Phenotype of T cells and co-stimulatory molecules expression on T lymphocytes of CL patients ( $n = 17$ ) stimulated *in vitro* with SLA in the presence or absence of *S. mansoni* antigens rSm29, rSmTSP-2 or with a fraction of *S. mansoni* soluble adult worm antigen (SWAP) P3H. Frequency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (A), expression of CD28 and CTLA-4 in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (B and C, resp.) and the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells ( $n = 13$ ) (D). Cells were stained for surface expression of CD4, CD8, CD25 and CD28, while the expression of CTLA-4 and Foxp3 were evaluated intracellularly using flow cytometry. \* $P < 0.05$  cultures without stimulation (WS) versus SLA + *S. mansoni* antigens; <sup>#</sup> $P < 0.05$  SLA versus SLA + *S. mansoni* antigens (Wilcoxon matched pairs test).

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells ( $10 \pm 2.4\%$  and  $10.3 \pm 1.9\%$ , resp.) compared to cultures with SLA in the absence of *S. mansoni* antigens ( $8.1 \pm 1.8\%$ ;  $P < 0.05$ , Figure 3(D)). The frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells was also higher in cultures stimulated with SLA plus P3H compared to nonstimulated cultures (Figure 3(D)).

#### 4. Discussion

The Th1 immune response associated with macrophage activation and killing of *Leishmania* sp. is paradoxically related to the development of cutaneous and mucosal leishmaniasis. In an attempt to control parasite growth, activated macrophages

release high levels of proinflammatory cytokines and nitrogen and oxygen reactive intermediates, leading to a tissue lesion.

A balance between the proinflammatory response characterized by the production of IFN- $\gamma$  and TNF, and the regulatory response with the production of IL-10 has been observed in individuals exposed to the *Leishmania braziliensis* in endemic areas of leishmaniasis in Brazil. Those individuals do not develop the disease and they are designated as "subclinical" subjects (37). The balanced immune response described in these individuals may be the key to achieving a harmless host-parasite relationship.

There are other evidences that IL-10 is capable of downmodulating the inflammatory response associated with

human tegumentary leishmaniasis [4, 38–40]. However, mononuclear cells of mucosal leishmaniasis (ML) patients have a decreased ability to produce this cytokine and to respond to IL-10 after *in vitro* restimulation with *L. braziliensis* antigen [3].

Recently it has been shown that during chronic *Schistosoma mansoni* infection, cells from the innate immune response, such as monocytes and regulatory T cells produce high levels of IL-10 [24, 41–43]. Our group has performed studies in an attempt to identify *S. mansoni* antigens with regulatory properties that enable them to downregulate the inflammatory process associated with certain immune-mediated diseases. For instance, we have shown that the *S. mansoni* antigens rSm29, rSmTSP-2, and PIII induce IL-10 and IL-5 production by PBMC of cutaneous leishmaniasis patients and that they are able to control the *in vitro* inflammatory response in a group of patients, independent of the clinical features, such as number and size of lesions [8]. In this current study we extended the assessment of the potential of the antigens rSm29, rSmTSP-2, and PIII in modifying the immune response during cutaneous leishmaniasis. Specifically, we evaluated the impact of the addition of these antigens to the cell culture stimulated with *Leishmania* antigens on monocyte and lymphocyte profile and activation status.

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and monocytes are key cells in the protection against leishmaniasis; however they have been associated to the inflammatory process and tissue lesion in the cutaneous form of disease [20, 44–46]. In leishmaniasis and also in some others diseases the role of different subsets of monocytes in the pathology has been described [47]. For more than two decades, monocytes have been classified into classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) and inflammatory, those which express the molecule CD16 and produce high levels of TNF- $\alpha$  [48]. The frequency of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> in CL patients was found to be significantly higher compared to healthy controls and they were positively correlated with the lesion size [22].

Recently, a new nomenclature has been used to classify human blood monocytes into three subsets: classical (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), and nonclassical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) [15]. The classical monocytes account for about 85% of the total monocytes and are characterized by the expression of IL-13R $\alpha$ 1, IL-10, and RANTES and by the expression of genes associated with anti-apoptosis and wound healing properties. The intermediate monocytes represent 5% of monocytes, express high levels of HLA-DR and are associated with antigen processing and presentation to T cell and T cell activation. Nonclassical subset are characterized by a low expression of CD14 and high expression of CD16 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>). They represent 10% of human monocytes and studies have shown that they express genes associated with cytoskeletal rearrangement which account for their highly mobility and for the patrolling behavior *in vivo* [16, 47].

Since the roles of the different monocyte subsets in cutaneous leishmaniasis remain unclear, we decided to evaluate not only their frequency in leishmaniasis patients, but also whether the addition of *S. mansoni* antigens would alter the profile of these cells in an *in vitro* study.

The addition of the antigens rSm29 and PIII to the PBMC cultures stimulated with SLA increased the frequency of nonclassical monocytes. This was not expected as a cell with high mobility and migratory capacity [16, 47], they may contribute to *Leishmania* metastasis and consequent development of more severe forms of the disease, such as the mucosal and disseminated forms.

We found, however, that the *S. mansoni* antigens used in this study, particularly PIII, diminished the expression of HLA-DR as well as the expression of the co-stimulatory molecules B7.1 and B7.2 on different monocyte subsets. A downmodulation of monocyte activation is desirable in leishmaniasis and may result in a reduced inflammatory process.

In this study, we also evaluated the expression of co-stimulatory molecules in T cells. We observed a significant increase in the frequency of CD4<sup>+</sup> T cells by the presence of the rSm29 antigen in the cultures. The addition of rSmTSP-2 and PIII antigens to the cultures stimulated with SLA increased the expression of CTLA-4 in CD4<sup>+</sup> T cells and also expanded the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells. We previously showed that *S. mansoni* infection expands CD4<sup>+</sup> T cell population of the regulatory profile in *S. mansoni*-infected asthmatic individuals [24]. In such allergic disease, *S. mansoni* antigens downmodulate the Th2 exacerbated inflammatory response *in vitro* by inducing the production of IL-10 and the expression of the regulatory molecules, CTLA-4 in T lymphocytes [9, 24, 43]. In a murine model of ovalbumin-induced asthma, inhibition of lung inflammatory process, by *S. mansoni* eggs or by the *S. mansoni* antigens, Sm22.6, PIII, and rSm29 were associated with an increase in the number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells and high levels of IL-10 production [49, 50].

T cell-mediated immunity is fundamental to host protection against *Leishmania* sp. and the activation of T cells depends upon signals from the interaction between the co-stimulatory molecules CD28 to its ligands B7.1 and B7.2 on antigen presenting cells (APCs) [23]. We evaluated the expression of CD28 on lymphocytes in cultures stimulated with SLA with or without the addition of *S. mansoni* antigens and found that the expression of this molecule on CD8<sup>+</sup> T cells was higher in cultures stimulated with rSm29 compared with SLA alone. These results suggest that the CD8<sup>+</sup> T cells became more activated in the presence of rSm29. There was, however, an increased expression of CTLA-4 in CD4<sup>+</sup> T cells, a molecule which is expressed to inhibit the T cell activation when rSmTSP-2 and PIII were added to the cultures. *In vitro* study has shown that the addition of CTLA-4-Ig to block CD28-B7 interaction in CL patients, PBMC cultures stimulated with *Leishmania* antigen led to a downmodulation of IFN- $\gamma$ , IL-10, and TNF secretion [27]. Our findings suggest that the CD4<sup>+</sup> T cells were downmodulated by the presence of the rSmTSP-2 and PIII. These antigens were also able to increase the frequency of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells.

In a survey performed by O'Neal et al. [51], the prevalence of *S. mansoni* infection in cutaneous leishmaniasis patients from the endemic area of Corte de Pedra, Bahia, Brazil was 16.7% [51]. The authors also showed that

coinfecting individuals tended to have small lesion size, however in the univariate model, the presence of helminth coinfection was associated with delayed lesion healing. When they evaluated infection with *S. mansoni* and *Strongyloides stercoralis* there was no difference in lesion healing compared to patients infected with geohelminths such as *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, and *Trichuris trichiura*.

Studies conducted by the same group in the endemic area of leishmaniasis in Brazil demonstrated that the use of immunomodulatory agents such as granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and pentoxifylline, an inhibitor of TNF production, can lead to faster healing time and higher cure rate in cutaneous leishmaniasis [52–55]. It has also been reported that intralesional injections of GM-CSF reduce healing time of CL ulcers by 50%. Moreover, Santos et al. [53] showed that GM-CSF applied locally in low doses as an adjuvant to pentavalent antimonial therapy, significantly decreases the healing time of CL ulcers, reducing the dose of antimony administered and/or the duration of antimonial therapy. These studies indicate that down-modulation of the inflammatory response in CL patients is associated with lesion cure and give support to the idea that inhibition of the strong inflammatory response early after *Leishmania* infection could avert tissue damage.

In this context, the data presented herein suggest that *S. mansoni* antigens are capable of downregulating monocyte and T lymphocyte response to the *Leishmania* antigen *in vitro*, possibly through mechanisms that involve negative signaling by CTLA-4 and the action of regulatory T cells. This knowledge could contribute to the development of future strategies to prevent and treat cutaneous and mucosal leishmaniasis.

### Conflict of Interests

The authors have no conflict of interests concerning the work reported in this paper.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the people of the leishmaniasis-endemic area in Corte de Pedra-Bahia for their participation in our study; Dr. Lutz Henrique Guimarães, Dr. Paulo Machado, and Ednaldo Lago who assisted in data collection and Hana Khidir and Whitney Oriana for the review of the paper. This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq) and by the NIH Grant no. NIH AI 088650. M. I. Araújo, A. M. Goes, S. O. Costa, and E. M. Carvalho are investigators supported by CNPq.

### References

- [1] P. Desjens, "Leishmaniasis: public health aspects and control," *Clinics in Dermatology*, vol. 14, no. 5, pp. 417–423, 1996.
- [2] A. Schriefer, A. L. F. Schriefer, A. Goes-Neto et al., "Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis," *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 1, pp. 508–514, 2004.
- [3] O. Bacellar, H. Lessa, A. Schriefer et al., "Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients," *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 12, pp. 6734–6740, 2002.
- [4] A. Ribeiro-de-Jesus, R. P. Almeida, H. Lessa, O. Bacellar, and E. M. Carvalho, "Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 31, no. 1, pp. 143–148, 1998.
- [5] D. Sowell, Z. Qing, E. Reinke et al., "Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization," *International Immunology*, vol. 15, no. 1, pp. 59–69, 2003.
- [6] A. Cooke, P. Tonks, E. M. Jones et al., "Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice," *Parasite Immunology*, vol. 21, no. 4, pp. 169–176, 1999.
- [7] O. Aochina and D. Harn, "Prevention of psoriasis-like lesions development in B6/129 mice by helminth glycans," *Experimental Dermatology*, vol. 15, no. 6, pp. 461–468, 2006.
- [8] A. M. Baifca, L. S. Cardoso, S. C. Oliveira et al., "Schistosoma mansoni antigens alter the cytokine response *in vitro* during cutaneous leishmaniasis," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 106, pp. 856–863, 2011.
- [9] A. J. G. Simpson, P. Hagan, F. Hackett, P. Omer Ali, and S. R. Smithers, "Epitopes expressed on very low M(r) *Schistosoma mansoni* adult tegumental antigens conform to a general pattern of life-cycle cross-reactivity," *Parasitology*, vol. 100, part 1, pp. 73–81, 1990.
- [10] E. C. Cardoso, J. M. R. Pinho, V. Azevedo, and S. C. Oliveira, "Identification of a new *Schistosoma mansoni* membrane-bound protein through bioinformatic analysis," *Genetics and Molecular Research*, vol. 5, no. 4, pp. 609–618, 2006.
- [11] M. H. Tran, M. S. Pearson, J. M. Bethony et al., "Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 7, pp. 835–840, 2006.
- [12] C. Hirsch and A. M. Goes, "Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation *in vitro*," *Parasitology*, vol. 112, no. 6, pp. 529–535, 1996.
- [13] C. Hirsch, C. S. Zouain, J. B. Alves, and A. M. Goes, "Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an antionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm," *Parasitology*, vol. 115, part 1, pp. 21–28, 1997.
- [14] L. S. Cardoso, S. C. Oliveira, R. P. Souza et al., "Schistosoma mansoni antigens modulate allergic response *in vitro* in cells of asthmatic individuals," *Drug Development Research*, vol. 72, pp. 538–548, 2011.
- [15] L. Ziegler-Holtbrock, P. Anzuta, S. Crowe et al., "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood," *Blood*, vol. 116, no. 16, pp. e74–e80, 2010.
- [16] K. L. Wong, J. I. Tai, W. C. Wong et al., "Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and non-classical human monocyte subsets," *Blood*, vol. 118, pp. 16–31, 2011.
- [17] J. Cros, N. Cagnard, K. Woolard et al., "Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors," *Immunity*, vol. 33, no. 3, pp. 375–386, 2010.
- [18] J. Y. Zhang, Z. S. Zou, A. Huang et al., "Hyper-activated pro-inflammatory CD16<sup>+</sup> monocytes correlate with the severity of liver injury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 3, Article ID e17484, 2011.

- [19] Y. Rodríguez-Munoz, S. Martín-Vilchez, R. López-Rodríguez et al., "Peripheral blood monocyte subsets predict antiviral response in chronic hepatitis C," *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 34, pp. 960–971, 2011.
- [20] J. Han, B. Wang, M. Han et al., "CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> rather than CD14<sup>low</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients," *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, vol. 52, no. 5, pp. 553–559, 2009.
- [21] E. L. Azevedo, F. C. Neves-Souza, A. R. Alvarenga et al., "Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever," *Immunology*, vol. 130, no. 2, pp. 202–216, 2010.
- [22] G. Soares, A. Barral, J. M. Costa, M. Barral-Neto, and J. Van Weyenbergh, "CD16<sup>+</sup> monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 79, no. 1, pp. 36–39, 2006.
- [23] K. S. Hathcock, G. Laszlo, C. Pacifico, P. Linsley, and R. J. Hodes, "Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 180, no. 2, pp. 631–640, 1994.
- [24] R. R. Oliveira, K. J. Gollob, J. P. Figueiredo et al., "Schistosoma mansoni infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma," *Microbes and Infection*, vol. 11, no. 2, pp. 223–229, 2009.
- [25] T. L. Walunas, D. J. Lenschow, C. Y. Bakker et al., "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation," *Immunity*, vol. 1, no. 5, pp. 405–413, 1994.
- [26] J. E. Brunet, F. Denizot, and M. E. Luciani, "A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4," *Nature*, vol. 328, no. 6127, pp. 267–270, 1987.
- [27] C. Favali, D. Costa, L. Afonso et al., "Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis," *Microbes and Infection*, vol. 7, no. 1, pp. 86–92, 2005.
- [28] G. I. Brodskyn, G. K. DeKrey, and R. G. Tilus, "Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro," *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 2, pp. 665–672, 2001.
- [29] H. Yagi, T. Nomura, K. Nakamura et al., "Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells," *International Immunology*, vol. 16, no. 11, pp. 1643–1656, 2004.
- [30] C. Bascher-Ailan, J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler, "CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood," *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 3, pp. 1245–1253, 2001.
- [31] C. Romagnani, M. Della Chiesa, S. Kohler et al., "Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4<sup>+</sup> T helper cells and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> T regulatory cells," *European Journal of Immunology*, vol. 35, no. 8, pp. 2452–2458, 2005.
- [32] Y. Belkaid and K. Tarbell, "Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions," *Annual Review of Immunology*, vol. 27, pp. 551–589, 2009.
- [33] Y. Belkaid, C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach, and D. L. Sacks, "CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity," *Nature*, vol. 420, no. 6915, pp. 502–507, 2002.
- [34] S. G. Reed, E. M. Carvalho, C. H. Sherbert et al., "In vitro responses to *Leishmania* antigens by lymphocytes from patients with leishmaniasis or Chagas' disease," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 85, no. 3, pp. 690–696, 1990.
- [35] L. S. Cardoso, M. I. Aratijo, A. M. Góes, L. C. Pacifico, R. R. Oliveira, and S. C. Oliveira, "Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis," *Microbial Cell Factories*, vol. 6, article 1, 2007.
- [36] M. S. Pearson, D. A. Pickering, H. J. McSorley et al., "Enhanced protective efficacy of a chimeric form of the schistosomiasis vaccine antigen Sm-TSP-2," *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, article e1564, 2011.
- [37] I. Follador, C. Aratijo, O. Bacellar et al., "Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 34, no. 11, pp. E54–E58, 2002.
- [38] L. R. V. Antonelli, W. O. Dutra, R. R. Oliveira et al., "Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>)  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis," *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 11, pp. 6317–6323, 2006.
- [39] S. T. Gaze, W. O. Dutra, M. Lessa et al., "Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population," *Serbian Journal of Immunology*, vol. 63, no. 1, pp. 70–78, 2006.
- [40] P. N. Rocha, R. P. Almeida, O. Bacellar et al., "Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 180, no. 5, pp. 1731–1734, 1999.
- [41] M. I. A. S. Aratijo, B. Hoppe, M. Medeiros et al., "Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 190, no. 10, pp. 1797–1803, 2004.
- [42] M. Hesse, C. A. Piccirillo, Y. Belkaid et al., "The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells," *Journal of Immunology*, vol. 172, no. 5, pp. 3157–3166, 2004.
- [43] M. I. Aratijo, B. S. Hoppe, M. Medeiros Jr., and E. M. Carvalho, "Schistosoma mansoni infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 99, no. 5, pp. 27–32, 2004.
- [44] M. Rosol, S. Krans, M. Plerer, C. Baerwald, and U. Wagner, "The CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 64, pp. 671–677, 2011.
- [45] W. K. Kim, Y. Sun, H. Do et al., "Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 87, no. 4, pp. 557–567, 2010.
- [46] L. Ziegler-Hellbrock, "The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 81, no. 3, pp. 584–592, 2007.
- [47] K. L. Wong, W. H. Yap, J. J. Tai, S. M. Ong, T. M. Dang, and S. C. Wong, "The three human monocyte subsets: Implications for health and disease," *Immunology Research*, vol. 53, pp. 41–57, 2012.
- [48] B. Paslick, D. Fieger, and H. W. Lorns Ziegler-Hellbrock, "Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood," *Blood*, vol. 74, no. 7, pp. 2527–2534, 1989.
- [49] L. S. Cardoso, S. C. Oliveira, and M. I. Aratijo, "Schistosoma mansoni antigens as modulators of the allergic inflammatory response in asthma," *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders*, vol. 12, pp. 24–32, 2012.

- [50] L. G. G. Pacifico, F. A. V. Marinho, C. T. Fonseca et al., "Schistosoma mansoni antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells independent of Interleukin-10," *Infection and Immunity*, vol. 77, no. 1, pp. 98–107, 2009.
- [51] S. E. O'Neal, L. H. Galmaras, P. R. Machado et al., "Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 195, no. 1, pp. 142–148, 2007.
- [52] H. A. Lessa, P. Machado, F. Lima et al., "Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentostyline plus antimony," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 65, no. 2, pp. 87–89, 2001.
- [53] J. B. Santos, A. B. De Jesus, P. R. Machado et al., "Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 190, no. 10, pp. 1793–1796, 2004.
- [54] R. F. Almeida, J. Brito, P. L. Machado et al., "Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 73, no. 1, pp. 79–81, 2005.
- [55] R. Almeida, A. D'Oliveira Jr., P. Machado et al., "Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 180, no. 5, pp. 1735–1737, 1999.

## 5.6. RESUMO DOS RESULTADOS

1. A adição dos antígenos de *S. mansoni* às culturas de CMSP foi capaz de reduzir os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF, em um grupo de pacientes, sendo seguido pelo aumento de IL-10, principalmente quando se utilizou o rSm29;
2. De um modo geral, não houve diferença nos parâmetros clínicos entre os pacientes com LC que apresentaram ou não redução na produção de IFN- $\gamma$  e TNF pela presença dos antígenos.
3. A adição dos antígenos rSm29 e PIII, às culturas de CMSP, expandiu a população dos monócitos não-clássicos comparado às culturas estimuladas somente com SLA;
4. A adição de PIII, às culturas de CMSP, reduziu a expressão de HLA-DR em monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) e intermediários (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), comparado às culturas estimuladas somente com SLA e a adição de rSm29 reduziu a expressão de HLA-DR em monócitos não-clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>);
5. A adição de PIII e rSmTSP-2 às culturas de CMSP estimuladas com SLA resultou na regulação da expressão de CD80 em monócitos não-clássicos e da expressão de CD86 em monócitos intermediários, respectivamente;
6. A adição do antígeno rSm29 às culturas de CMSP estimuladas com SLA aumentou a frequência de células TCD4<sup>+</sup> e a expressão de CD28 nas células TCD8<sup>+</sup>;
7. A adição dos antígenos rSmTSP-2 e PIII aumentou a expressão de CTLA-4 em células TCD4<sup>+</sup> e também expandiu a frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a capacidade de alguns antígenos do *Schistosoma mansoni* em modular a resposta inflamatória induzida *in vitro* pelo antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose cutânea. Foi mostrado que a adição dos antígenos rSm29, rSmTSP-2 e PIII às culturas estimuladas com SLA levou à redução dos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF e ao aumento da produção de IL-10 em um número significativo de pacientes.

A produção de IFN- $\gamma$  é fundamental para a destruição da *Leishmania* spp. pelos macrófagos (LIEW e cols, 1991). Por outro lado, uma resposta imune do tipo Th1 exacerbada com alta produção de IFN- $\gamma$  e TNF, bem como uma falta de resposta regulatória, está associada ao desenvolvimento de lesões na leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM), como revisto por Ribeiro de Jesus e cols (2008). A nossa hipótese é de que a IL-10, citocina com propriedades modulatórias, seja capaz de controlar a resposta do tipo Th1 exacerbada, associada ao desenvolvimento de lesão na LC e LM. Alta produção de IL-10, entretanto, pode se associar à manutenção do parasitismo (BELKAID e cols, 2001). Uma resposta imune equilibrada deve ser a chave para uma relação inofensiva entre parasita-hospedeiro.

Existem evidências na literatura de que a infecção por *Schistosoma* spp. ou seus produtos, protegem contra o desenvolvimento de doenças mediadas pela resposta imune tanto do tipo Th1, quanto do tipo Th2, em murinos e em humanos (ARAÚJO e cols, 2004; ARAUJO e cols, 2000; MEDEIROS e cols, 2004; MEDEIROS e cols, 2003; PACIFICO e cols, 2009). Em estudos experimentais, por exemplo, tem sido demonstrado que a infecção pelo *S. mansoni* é capaz de prevenir o desenvolvimento de algumas doenças autoimunes, a exemplo do diabetes do tipo I, encefalomielite autoimune e psoríase (ATOCHINA E HARN, 2006; COOKE e cols, 1999; SEWELL e cols, 2003).

Nosso grupo tem realizado alguns estudos na tentativa de identificar antígenos do *S. mansoni* com propriedades regulatórias, que permitam modular o processo inflamatório associado a determinadas doenças de base imunológica. Em um destes estudos, em modelos experimentais de asma induzida por OVA, a injeção dos antígenos

do tegumento do *S. mansoni* Sm22.6 e Sm29 e também do PIII, uma fração do antígeno bruto derivado do verme adulto, resultou na diminuição da resposta inflamatória do tipo Th2, que é associada à patologia da doença (CARDOSO e cols, 2010).

Os principais mecanismos descritos como moduladores da resposta imune são as células da resposta imune inata e adaptativa capazes de produzir IL-10 (ARAÚJO e cols, 2004; HESSE e cols, 2004; OLIVEIRA e cols, 2009). Tem sido demonstrado que a fosfatidilserina de *S. mansoni* tem a capacidade de estimular as células apresentadoras de antígeno de indivíduos não infectados a produzir IL-10 por mecanismos dependentes de toll-like receptor (TLR)-2, que promove a maturação de células T regulatórias (VAN DER KLEIJ e cols, 2002). Isto sugere que existem padrões moleculares (PAMPs) associados aos helmintos que estão envolvidos na modulação da resposta imune.

Uma vez em que há uma deficiência na produção de IL-10 na leishmaniose cutânea (BACELLAR e cols, 2002), a utilização de antígenos do *S. mansoni* capazes de induzir a produção desta citocina deve ser benéfica para estes pacientes. A escolha dos antígenos utilizados neste estudo foi feita porque eles são secretados pela membrana e/ou tegumento do verme adulto de *S. mansoni*. As proteínas secretadas ou localizadas pela superfície do *Schistosoma* spp., que estão em contato íntimo com os tecidos do hospedeiro, pode ser mais eficaz em desencadear processos imunorreguladores (SIMPSON e cols, 1990).

Além de avaliar neste estudo a capacidade dos antígenos rSm29, rSmTSP-2 e PIII em alterar a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP), nós testamos também a possibilidade destes antígenos de alterar a frequência de linfócitos e monócitos e a expressão de moléculas co-estimulatórias nestas células em resposta ao antígeno solúvel de *L. braziliensis* em pacientes com leishmaniose cutânea.

Demonstramos, então, que a adição dos antígenos do *S. mansoni* às culturas resultou na diminuição da produção de IFN- $\gamma$  e em menor extensão de TNF. A produção das citocinas inibitórias da resposta inflamatória do tipo Th1, como IL-10 e IL-5, também foi avaliada. A adição dos antígenos às culturas resultou em um aumento dos níveis de IL-10 em mais da metade dos indivíduos, enquanto que a produção de IL-5 foi aumentada em um menor percentual dos pacientes com LC. A redução dos níveis de IFN- $\gamma$  pela presença dos antígenos *S. mansoni* alcançou cerca de 80%, sendo mais baixa

a redução dos níveis de TNF. A adição dos antígenos às culturas resultou em um aumento da produção de IL-10 em até 300% desta citocina.

Tem sido relatado que na leishmaniose cutânea humana causada por *L. braziliensis*, subpopulações de linfócitos expressam poucos ou indetectáveis números de células TCD4<sup>+</sup> produtoras de IL-4 e IL-5 (BOTTREL e cols, 2005) e que o aumento dessas citocinas do padrão Th2 poderia representar uma resposta compensatória levando à regulação da resposta inflamatória do tipo 1. Observamos neste estudo, um aumento dos níveis de IL-5, após adição dos antígenos de *S. mansoni* às culturas de células estimuladas com SLA, demonstrando que os antígenos foram capazes de induzir, em um grupo de pacientes com LC, aumento na produção da citocina regulatória IL-10 e da citocina do tipo Th2, a IL-5.

Desde que observamos que havia um grupo de pacientes nos quais foi observada diminuição da produção de IFN- $\gamma$  pela adição dos antígenos de *S. mansoni*, enquanto esses antígenos não modularam a resposta em outro grupo de pacientes, resolvemos avaliar possíveis fatores associados à resposta aos antígenos de *S. mansoni*.

Os níveis basais de IFN- $\gamma$  em resposta ao SLA, por exemplo, foram comparados entre os grupos de pacientes que tiveram ou não redução na produção desta citocina. Não foram encontradas diferenças significativas na média dos níveis basais de IFN- $\gamma$ , em resposta à SLA nos dois grupos de pacientes quando se utilizou rSm29 e rSmTSP-2. Inesperadamente, os níveis basais de IFN- $\gamma$  foram maiores em pacientes que tiveram redução desta citocina por meio da adição de PIII, em comparação ao grupo que não teve redução desta citocina. Em CMSP de indivíduos saudáveis, tem sido demonstrado que a inibição da produção de IFN- $\gamma$  tende a ser maior em concentrações basais mais baixas desta citocina (ITO e cols, 1999). Os níveis basais médios de TNF em resposta à SLA não diferiram entre os pacientes que tiveram ou não redução nos níveis desta citocina pela adição dos antígenos de *S. mansoni* (BAFICA e cols, 2011).

Foi também comparada, a frequência de pacientes que apresentaram um aumento nos níveis de IL-10 e IL-5, quando antígenos de *S. mansoni* foram adicionados às culturas de CMSP nos grupos de pacientes que tiveram ou não redução na produção de IFN- $\gamma$  pela presença dos antígenos de *S. mansoni*. Não houve diferença significativa entre os grupos. Estes achados indicam que os antígenos do *S. mansoni*, apesar de serem capazes de induzir a produção de citocinas do tipo Th2 e regulatórias, devem

promover outros mecanismos para a regulação da resposta inflamatória na leishmaniose cutânea. A IL-10 pode ser essencial, mas não suficiente para regular a produção de IFN- $\gamma$  e TNF na leishmaniose e uma possível explicação é a diminuição da expressão do receptor de IL-10 na lesão de pacientes com leishmaniose mucosa, como descrito por FARIA e cols (2005). Este poderia ser o caso das células de alguns pacientes com leishmaniose cutânea no presente estudo, onde se observou alta produção de IL-10, mas com pouca modulação da resposta imune celular.

Foi também demonstrado neste estudo, o potencial dos antígenos rSm29 rSmTSP-2 e PIII em modificar o fenótipo de monócitos e de linfócitos de pacientes com LC e o estado de ativação destas células em resposta ao SLA. Linfócitos TCD4<sup>+</sup> e monócitos são descritos como células chave na proteção contra a *Leishmania*, no entanto, essas células têm sido associadas também com o processo inflamatório e lesão tecidual da forma cutânea da doença (HAN e cols, 2009; ROSSOL e cols, 2011; KIM e cols, 2010; ZIEGLER-HEITBROCK, 2007).

Durante mais de duas décadas, os monócitos foram classificados em clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) e inflamatórios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>), devido à expressão da molécula CD16 e a produção de elevados níveis de TNF (PASSLICK e cols, 1989). Em um estudo na leishmaniose humana, a frequência de monócitos inflamatórios em pacientes com LC, mostrou-se significativamente mais elevada em comparação aos controles saudáveis e foram correlacionadas positivamente com o tamanho da lesão (SOARES e cols, 2006).

De acordo com a nova classificação, os monócitos podem ser considerados como clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediários (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e não-clássicos (CD14<sup>-</sup>CD16<sup>++</sup>) (ZIEGLER-HEITBROCK, 2010). O papel dos diferentes subtipos de monócitos na leishmaniose cutânea ainda não está esclarecido. Decidimos então avaliar não só a frequência e o grau de ativação destes monócitos em pacientes com leishmaniose, mas também se a adição de antígenos de *S. mansoni* alteraria o perfil destas células em um estudo *in vitro*.

A adição dos antígenos rSm29 e PIII, às culturas de CMSP estimuladas com SLA, aumentou a frequência de monócitos não-clássicos. Isto não era esperado, uma vez que uma célula com elevada mobilidade e capacidade migratória (WONG e cols, 2011; WONG e cols, 2012) poderia teoricamente contribuir para a metástase da *Leishmania* e conseqüente desenvolvimento das formas mais graves da doença, tais

como as formas mucosa e disseminada. Foi observado, contudo, que os antígenos de *S. mansoni* utilizados neste estudo, particularmente o PIII, diminuíram a expressão de HLA-DR, bem como a expressão de moléculas co-estimuladoras B7.1 e B7.2 nos diferentes subgrupos de monócitos. Uma modulação da ativação de monócitos é desejável na leishmaniose e pode resultar em um reduzido processo inflamatório.

Em estudos recentes, tem sido descrito o papel dos diferentes subgrupos de monócitos em diversas doenças infecciosas (WONG e cols, 2012). Uma alta frequência de subgrupos de monócitos CD16<sup>+</sup> tem sido demonstrada em infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Eles observaram expansão de monócitos intermediários (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e monócitos não-clássicos (CD14<sup>-</sup>CD16<sup>++</sup>) e isso pode estar relacionado a uma alta produção de IL-10 em pacientes com tuberculose (TB), desde que a IL-10 é capaz de induzir a expressão de CD16 *in vitro* (CASTAÑO e cols, 2011). Similar a TB, as proporções dos monócitos intermediários e não-clássicos foram aumentadas na hepatite B (HBV), hepatite C (HCV), HIV e Dengue (ZHANG e cols, 2011; RODRIGUEZ-MUNOZ e cols, 2011; HAN e cols, 2009; AZEREDO e cols, 2010).

A imunidade mediada por células T é fundamental para a proteção contra a *Leishmania* spp. e a ativação das células T depende de sinais provenientes da interação entre a molécula co-estimulatória CD28 aos seus ligantes B7.1 e B7.2 nas células apresentadoras de antígenos (APCs) (HATHCOCK e cols, 1994). Nós avaliamos a expressão de CD28 nos linfócitos em culturas estimuladas com SLA na presença ou ausência dos antígenos de *S. mansoni* e foi observado aumento da expressão desta molécula nas células TCD8<sup>+</sup> em culturas estimuladas com rSm29, sugerindo uma ativação destas células. Houve, entretanto, um aumento na expressão de CTLA-4 em células TCD4<sup>+</sup>, uma molécula que é expressa para inibir a ativação de células T, quando o rSmTSP-2 e o PIII foram adicionados às culturas. Estudos *in vitro* mostraram que a adição de anticorpo anti-CTLA-4, para bloquear a interação CD28-B7, em culturas de CMSP de pacientes com LC, estimuladas com antígeno de *Leishmania*, modulou a secreção de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF (FAVALI e cols, 2005). Os nossos resultados sugerem que as células TCD4<sup>+</sup> foram moduladas pela presença dos antígenos rSmTSP-2 e PIII. Estes antígenos também foram capazes de aumentar a frequência das células regulatórias TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>.

Estudos prévios do nosso grupo mostraram que em indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni* havia expansão de células TCD4<sup>+</sup> (OLIVEIRA e cols, 2009). O uso de antígenos de *S. mansoni* modulou *in vitro* a resposta inflamatória do tipo Th2 na asma, enquanto que induziu a produção de IL-10 e a expressão da molécula reguladora, CTLA-4 em linfócitos T (SIMPSON e cols, 1990; OLIVEIRA e cols, 2009; ARAUJO e cols, 2004). Em modelo murino de asma induzida por ovalbumina, a inibição do processo inflamatório pulmonar, pela injeção de ovos de *S. mansoni* ou pela imunização com os antígenos de *S. mansoni* Sm22.6, PIII e rSm29, foi associada a um aumento no número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e altos níveis de IL-10 (CARDOSO e cols, 2012; PACIFICO e cols, 2009).

O tratamento convencional da leishmaniose cutânea com antimonial pentavalente (SBv) de um modo geral é eficaz. Esta droga pode, entretanto levar a efeitos secundários graves que incluem pancreatite, alterações de enzimas hepáticas e arritmia cardíaca (BERMAN, 1997). A associação de imunomoduladores ao tratamento convencional, tais como GM-CSF, aplicados em doses baixas localmente como terapia adjuvante, acelera a cicatrização de lesões crônicas (JASCHKE e cols, 1999). Além disso, Santos e cols (2004) observaram que o tratamento reduziu a dose necessária do antimônio e / ou a duração da terapia antimonial. Entretanto, porque GM-CSF pode ter uma função em ambas as respostas Th1 e Th2, tem sido muito difícil elucidar sua função na leishmaniose. Estudos mostram que GM-CSF pode agravar a doença, induzindo proliferação de macrófago e facilitando a sobrevivência do parasito intracelular e não estimula atividade leishmanicida destas células, aumentando assim, a suscetibilidade à infecção (SOLBACH e cols, 1988; SOLBACH e LASKAY, 2000).

Estes estudos indicam que a modulação da resposta inflamatória em pacientes com LC está associada com a cura da lesão e dá suporte à ideia de que a inibição da resposta inflamatória, logo após a infecção por *Leishmania*, poderia evitar danos teciduais. Outras drogas, tais como a pentoxifilina, que inibem a síntese de TNF quando associada à terapia antimonial, aumenta a taxa de cura e diminuem o tempo de cicatrização da leishmaniose cutânea e mucosa (LESSA e cols, 2001; MACHADO e cols, 2007). Portanto, a combinação de um tratamento convencional com uma estratégia imunomoduladora pode ser mais eficaz na prevenção ou diminuição da lesão tecidual na leishmaniose cutânea ou mucosa.

Estas drogas, entretanto, inibem a resposta imune e podem aumentar a suscetibilidade a outras infecções, a exemplo de micro-organismos intracelulares. Tem sido observado, por exemplo, que TNF é produzido em resposta às infecções por *Mycobacterium* sp. e é importante no seu controle. A adição de TNF exógeno às culturas de células ou em animais infectados com *Mycobacterium* sp., tem sido associada com o aumento da resistência à infecção, enquanto que a inibição de TNF relaciona-se com a diminuição da resistência a este micro-organismo. A adição de TNF a macrófagos humanos ou murinos infectados com *M. avium in vitro* resultou em aumento da morte intracelular da micobacteria (BERMUDEZ e cols, 1988; ERIKS e cols, 1997; HSU e cols, 1995).

Infecções helmínticas também parecem ter efeito modulatório sobre a resposta imune. Estudo realizado por O'Neal e cols (2007), mostrou que pacientes com LC co-infectados com helmintos tendiam a ter menores tamanhos de lesões, no entanto no modelo univariado, a presença de co-infecção helmíntica foi associada a retardo na cicatrização das lesões. Os autores discutem que este efeito parece ser devido a uma forte resposta imune Th2 induzida por infecções helmínticas em detrimento da resposta imune do tipo Th1, associada com a defesa do hospedeiro contra a infecção por *Leishmania* spp. Em outro estudo, no entanto, a introdução precoce da terapia anti-helmíntica não alterou os resultados em pacientes co-infectados com helmintos e *L. braziliensis* (NEWLOVE e cols, 2011).

Neste contexto, os dados aqui apresentados sugerem que os antígenos de *S. mansoni* são capazes de regular a resposta de monócitos e de linfócitos T ao antígeno de *Leishmania*, *in vitro*, possivelmente através de mecanismos que envolvem a sinalização negativa por CTLA-4 e a ação das células T regulatórias. Este conhecimento pode contribuir para o desenvolvimento de futuras estratégias para prevenir e/ou tratar a leishmaniose cutânea e mucosa.

## 7. CONCLUSÕES

Os antígenos do *S. mansoni* rSm29, rSmTSP-2 e PIII induzem a produção de IL-10 e IL-5 na leishmaniose cutânea e são capazes de controlar a resposta inflamatória do tipo Th1 *in vitro* num grupo de pacientes. Esta modulação parece envolver também a sinalização negativa por CTLA-4 e a ação de células T regulatórias. Este conhecimento pode contribuir para o desenvolvimento de futuras estratégias para a prevenção e tratamento da leishmaniose cutânea e mucosa.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. Lichtman, A. H., Pillai, S. *Imunologia Celular e Molecular*, 7<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Almeida R, D'Oliveira A, Jr., Machado P, Bacellar O, Ko AI, de Jesus AR, Mobashery N, Brito Santos J, Carvalho EM: Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*, 180:1735-1737, 1999.

Almeida RP, Brito J, Machado PL, AR DEJ, Schriefer A, Guimaraes LH, Carvalho EM: Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. *Am J Trop Med Hyg*, 73:79-81, 2005.

Amato Neto, Vicente e cols *Parasitologia: uma abordagem clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Antonelli LR, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KC, Guimaraes LH, Bacellar O, Gollob KJ. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*, 74:6317-6323, 2006.

Araujo MI, Lopes AA, Medeiros M, Cruz AA, Sousa-Atta L, Solé D, Carvalho EM. Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000 Oct;123(2):145-8.

Araujo MI, Hoppe B, Medeiros M, Jr., Alcantara L, Almeida MC, Schriefer A, Oliveira RR, Kruschewsky R, Figueiredo JP, Cruz AA, Carvalho EM. Impaired T Helper 2 Response to Aeroallergen in Helminth-Infected Patients with Asthma. *J Infect Dis*, 190:1797-1803, 2004.

Araujo MI, Hoppe BS, Medeiros M, Jr., Carvalho EM. *Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99:27-32, 2004.

Atochina O, Harn D: Prevention of psoriasis-like lesions development in fsn/fsn mice by helminth glycans. *Exp Dermatol*, 15:461-468, 2006.

Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Zagne SM, Nogueira RM, Oliveira-Pinto LM, Kubelka CF. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology*, 130:202-216, 2010.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*, 70:6734-6740, 2002.

Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, Carvalho EM. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2009 Jul 1;200(1):75-8.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 167:1245-1253, 2001.

Bafica AM, Cardoso LS, Oliveira SC, Loukas A, Varela GT, Oliveira RR, Bacellar O, Carvalho EM, Araujo MI: *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response *in vitro* during cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106:856-863, 2011.

Bafica AM, Cardoso LS, Oliveira SC, Loukas A, Goes A, Oliveira RR, Carvalho EM, Araujo MI: Changes in T-cell and Monocyte phenotypes *in vitro* by *S. mansoni* antigens in cutaneous leishmaniasis patients. *J. parasitol res.*2012.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, 420:502-507, 2002.

Belkaid Y, Tarbell K: Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (\*). *Annu Rev Immunol*, 27:551-589, 2009.

Belkaid Y., Hoffmann K. F., Mendez S., Kamhawi S., Udey M. C., Wynn T. A. and Sacks D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* 194, 1497-506, 2001.

Berman J. D. (1997) Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 24, 684-703.

Bermudez, L. E. M., and L. S. Young. 1988. Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN-g, is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J. Immunol.* 140:3006–3013.

Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86: 51-56, 1991.

Bittencourt AL, de Freitas LA, Pompeu ML, Vieira ML, Barral A. Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85: 53-59, 1990.

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunology Review* 173: 17-26, 2000.

Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *Journal of Experimental Medicine* 174: 1549-1555, 1991.

Bogdan C., Gessner A., Solbach W. and Rollinghoff M. (1996) Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol* 8, 517-25.

Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral- Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 84: 188-194, 1996.

Booth, M., J. K. Mwatha, e cols Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender. *J Immunol.* v. 172, n. 2, p. 1295- 303. 2004.

Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M, Barral A, Almeida RP, Mayrink W, Locksley R, Gollob KJ. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infection & Immunity* 69: 3232-3239, 2001.

Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E, Tacchini-Cottier F, Couppie P, Launois P. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun.* 2009 Apr;77(4):1465-74.

Braschi S, Wilson RA. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Feb;5(2):347-56.

Braschi S, Curwen RS, Ashton PD, Verjovski-Almeida S, Wilson A. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics.* 2006 Mar;6(5):1471-82.

Brodskyn CI, DeKrey GK, Titus RG. Influence of co-stimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. *Infect Immun,* 69:665-672, 2001.

Brunet, L. R., F. D. Finkelman, e cols IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J Immunol.* v. 159, n. 2, p. 777-85. 1997.

Buates, S. and Matlashewski, 1999. Treatment of experimental leishmaniasis with imunomodulators imiquimod and S-28463: Efficacy mode of action. *J. infection Dis.*,179: 1485-1494.

Cardoso FC, Pinho JM, Azevedo V, Oliveira SC: Identification of a new *Schistosoma mansoni* membrane-bound protein through bioinformatic analysis. *Genet Mol Res,* 5:609-618, 2006.

Cardoso, F. C., G. C. Macedo, et al. *Schistosoma mansoni* Tegument Protein Sm29 Is Able to Induce a Th1-Type of Immune Response and Protection against Parasite Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* v. 2, n. 10, p. e308. 2008.

Cardoso, F. C., R. N. Pacifico, et al. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin Exp Immunol.* v. 144, n. 3, p. 382-91. 2006.

Cardoso L. S., Oliveira S. C., Goes A. M., Oliveira R. R., Pacifico L. G., Marinho F. V., Fonseca C. T., Cardoso F. C., Carvalho E. M. and Araujo M. I. (2010). *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *Clin Exp Immunol* 160, 266-74.

Cardoso LS, Araujo MI, Goes AM, Pacifico LG, Oliveira RR, Oliveira SC. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fact*, 6:1, 2007.

Cardoso LS, Oliveira SC, Araujo MI: *Schistosoma mansoni* antigens as modulators of the allergic inflammatory response in asthma. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 12:24-32, 2012.

Cardoso LS, Oliveira SC, Souza RP, Goes AM, Oliveira RR, Alcantara LM, Araujo MI: *Schistosoma mansoni* antigens modulate allergic response in vitro in cells of asthmatic individuals. *Drug Development Research*, 72:538-548, 2011.

Carmo, E. (1999). Morbidade e mortalidade por esquistossomose mansônica na região Nordeste do Brasil. Instituto de Saúde Coletiva. Salvador, Universidade Federal da Bahia.

Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JLM, Reed S, Rocha H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Journal of Immunology*, 135: 4144-8, 1985.

Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* 152: 5949-5956, 1994.

Castaño D, García LF, Rojas M. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011 Sep;91(5):348-60.

Chitsulo, L., D. Engels, A. Montresor and L. Savioli (2000). "The global status of schistosomiasis and its control." *Acta Trop* 77(1): 41-51.

Cooke A, Tonks P, Jones FM, O'Shea H, Hutchings P, Fulford AJ, Dunne DW. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol*, 21:169-176, 1999.

Cooper P. J., Chico M. E., Rodrigues L. C., Ordonez M., Strachan D., Griffin G. E. and Nutman T. B. (2003). Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J Allergy Clin Immunol* 111, 995-1000.

Correa-Oliveira, R., L. C. Malaquias, e cols Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res*. v. 31, n. 1, p. 171-7. 1998.

Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, e cols Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, 33:375-386, 2010.

Del Prete, G., M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti and S. Romagnani (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production." *J Immunol* 150(2): 353-60.

Desjeux P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95, 239-43.

Desjeux P: Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*, 14:417-423, 1996.

Elliott, D. E., J. Li, e cols Exposure to schistosome eggs protects mice from TNB Sinduced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. v. 284, n. 3, p. G385-91. 2003.

Elloso MM, Scott P. Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *J Immunol*. 1999 Jun 1;162(11):6708-15.

Eriks, I. S., and C. L. Emerson. 1997. Temporal effect of tumor necrosis factor alpha on murine macrophages infected with *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun*. 65:2100–2106.

Faria D. R., Gollob K. J., Barbosa J., Jr., Schriefer A., Machado P. R., Lessa H., Carvalho L. P., Romano-Silva M. A., de Jesus A. R., Carvalho E. M. and Dutra W. O. (2005) Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 73, 7853-9.

Favali C, Costa D, Afonso L, Conceicao V, Rosato A, Oliveira F, Costa J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI: Role of co-stimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect*, 7:86-92, 2005.

Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*, 34:E54-58, 2002.

Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimaraes LH, Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol*, 63:70-78, 2006.

Guimarães, LH, Machado PL, et al. Clinical Aspects of Tegumentary Leishmaniasis. *Gaz. méd. Bahia* 2005;75:1(Jan-Jun):66-74.

Gustavson, S., C. S. Zouain, et al. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. *Parasitol Int*. v. 51, n. 3, p. 259-69. 2002.

Han J, Wang B, Han N, Zhao Y, Song C, Feng X, Mao Y, Zhang F, Zhao H, Zeng H: CD14(high)CD16(+) rather than CD14(low)CD16(+) monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 52:553-559, 2009.

Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, Mori A. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;137 Suppl 1:51-4.

Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 co-stimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med*, 180:631-640, 1994.

Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol*, 172:3157-3166, 2004.

Hirsch C, Goes AM: Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation in vitro. *Parasitology*, 112 ( Pt 6):529-535, 1996.

Hirsch C, Zouain CS, Alves JB, Goes AM: Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an anionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm. *Parasitology*, 115 ( Pt 1):21-28, 1997.

Hoffmann, K. F., A. W. Cheever, e cols IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol*. v. 164, n. 12, p. 6406-16. 2000.

Hsu, N., L. S. Young, and L. E. Bermudez. 1995. Response to stimulation with recombinant cytokines and synthesis of cytokines by murine intestinal macrophages infected with the *Mycobacterium avium* complex. *Infect. Immun.* 63:528–533.

Ito S., Ansari P., Sakatsume M., Dickensheets H., Vazquez N., Donnelly R. P., Larner A. C. and Finbloom D. S. (1999) Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* 93, 1456-63.

Jaschke E., Zabernigg A. and Gattringer C. (1999) Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied locally in low doses enhances healing and prevents recurrence of chronic venous ulcers. *Int J Dermatol* 38, 380-6.

Jones T.C. The effects of rhGM-CSF on macrophage function. *Eur J Cancer*. 1993;29A Suppl 3:S10-3. Review.

Jones T. C., Johnson W. D., Jr., Barretto A. C., Lago E., Badaro R., Cerf B., Reed S. G., Netto E. M., Tada M. S., Franca T. F. and e cols (1987) Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. *J Infect Dis* 156, 73-83.

Kim WK, Sun Y, Do H, Autissier P, Halpern EF, Piatak M, Jr., Lifson JD, Burdo TH, McGrath MS, Williams K. Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage. *J Leukoc Biol*, 87:557-567, 2010.

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

Lambertucci, J. R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. v. 35, n. 5, p. 399-404. 1993.

Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM: Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg*, 65:87-89, 2001.

Lieschke GJ, Burgess AW (1992). Granulocyte colony stimulating factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *N Engl J Med*, 327, 28-35, 99-106.

Liew F. Y., Li Y. and Millott S. (1991) 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.

Machado P. R., Lessa H., Lessa M., Guimaraes L. H., Bang H., Ho J. L. and Carvalho E. M. (2007) Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 44, 788-93.

Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol*. 2007;51(12):1139-47.

McKee, A. S. and E. J. Pearce. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol*. v. 173, n. 2, p. 1224-31. 2004.

McSorley S, Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY 1996. Immunology of murine leishmaniasis. *Clin Dermatol* 14: 451-464.

Medeiros M., Jr., Almeida M. C., Figueiredo J. P., Atta A. M., Mendes C. M., Araujo M. I., Taketomi E. A., Terra S. A., Silva D. A. and Carvalho E. M. (2004) Low frequency of positive skin tests in asthmatic patients infected with *Schistosoma mansoni* exposed to high levels of mite allergens. *Pediatr Allergy Immunol* 15, 142-7.

Medeiros M., Jr., Figueiredo J. P., Almeida M. C., Matos M. A., Araujo M. I., Cruz A. A., Atta A. M., Rego M. A., de Jesus A. R., Taketomi E. A. and Carvalho E. M. (2003) *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111, 947-51.

Montenegro, S. M., P. Miranda, e cols Cytokine production in acute versus chronic human *Schistosomiasis mansoni*: the cross-regulatory role of interferon gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J Infect Dis*. v. 179, n. 6, p. 1502- 14. 1999.

Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Apr;14(2):155-74. Review.

Murray H. W. and Cartelli D. M. (1983) Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J Clin Invest* 72, 32-44.

Murray H. W., Rubin B. Y. and Rothermel C. D. (1983) 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.

Netto EM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Costa JML, Cuba CC, Barreto AC, Badaró R, Johnson WD, Jones TC. Long-term follow-up of patients with *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* infection and treated with Glucantime. *Transaction Royal Society Tropical Medicine Hygiene* 84: 367-370, 1990.

NEVES, David P. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

Newlove T., Guimaraes L. H., Morgan D. J., Alcantara L., Glesby M. J., Carvalho E. M. and Machado P. R. (2011) Antihelminthic Therapy and Antimony in Cutaneous Leishmaniasis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Patients Co-Infected with Helminths and *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 84, 551-5.

Oliveira RR, Gollob KJ, Figueiredo JP, Alcantara LM, Cardoso LS, Aquino CS, Campos RA, Almeida MC, Carvalho EM, Araujo MI. *Schistosoma mansoni* infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. *Microbes Infect*, 11:223-229, 2009.

O'Neal SE, Guimaraes LH, Machado PR, Alcantara L, Morgan DJ, Passos S, Glesby MJ, Carvalho EM: Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*, 195:142-148, 2007.

Pacifico, L. G., C. T. Fonseca, e cols Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. *Immunobiology*. v. 211, n. 1-2, p. 97-104. 2006.

Pacifico LG, Marinho FA, Fonseca CT, Barsante MM, Pinho V, Sales-Junior PA, Cardoso LS, Araujo MI, Carvalho EM, Cassali GD, e cols *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells independent of interleukin-10. *Infect Immun*, 77:98-107, 2009.

Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, 74:2527-2534, 1989.

Pearce, E. J. and A. S. MacDonald. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol*. v. 2, n. 7, p. 499-511. 2002.

Pearson MS, Pickering DA, McSorley HJ, Bethony JM, Tribolet L, Dougall AM, Hotez PJ, Loukas A. Enhanced protective efficacy of a chimeric form of the schistosomiasis vaccine antigen Sm-TSP-2. *PLoS Negl Trop Dis*, 6:e1564, 2011.

Rabello, A. L., M. M. Garcia, R. A. Pinto da Silva, R. S. Rocha and N. Katz (1997). "Humoral immune responses in patients with acute *Schistosoma mansoni* infection who were followed up for two years after treatment." *Clin Infect Dis* 24(3): 304-8.

Read, S. and F. Powrie (2001). "CD4(+) regulatory T cells." *Curr Opin Immunol* 13(6): 644-9.

Reed SG, Carvalho EM, Sherbert CH, Sampaio DP, Russo DM, Bacelar O, Pihl DL, Scott JM, Barral A, Grabstein KH, e cols In vitro responses to *Leishmania* antigens by

lymphocytes from patients with leishmaniasis or Chagas' disease. *J Clin Invest*, 85:690-696, 1990.

Ribeiro de Jesus A., Luna T., Pacheco de Almeida R., Machado P. R. and Carvalho E. M. (2008) Pentoxifylline down modulate in vitro T cell responses and attenuate pathology in *Leishmania* and HTLV-I infections. *Int Immunopharmacol* 8, 1344-53.

Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, 31:143-148, 1998.

Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC, Barral A, Coffman RL, Carvalho EM. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*, 180:1731-1734, 1999.

Rodriguez-Munoz Y, Martin-Vilchez S, Lopez-Rodriguez R, Hernandez-Bartolome A, Trapero-Marugan M, Borque MJ, Moreno-Otero R, Sanz-Cameno P: Peripheral blood monocyte subsets predict antiviral response in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*, 34:960-971, 2011.

Romagnani C, Della Chiesa M, Kohler S, Moewes B, Radbruch A, Moretta L, Moretta A, Thiel A. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *Eur J Immunol*, 35:2452-2458, 2005.

Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum*, 64:671-677, 2011.

Royer, B., S. Varadaradjalou, P. Saas, J. J. Guillosson, J. P. Kantelip and M. Arock (2001). "Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10." *Clin Exp Allergy* 31(5): 694-704.

Saenz RE, de Rodrigues CG, Johnson CM, Berman JD. Efficacy and toxicity of pentostam against panamensis mucosal leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 394-398, 1991.

Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcaïs A, Argiro L, Dessein A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):6139-48.

Santos JB, de Jesus AR, Machado PR, Magalhaes A, Salgado K, Carvalho EM, Almeida RP: Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous Leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis*, 190:1793-1796, 2004.

Schriefer A, Schriefer AL, Goes-Neto A, Guimaraes LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun*, 72:508-514, 2004.

Sewell D, Qing Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sandor M, Fabry Z. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *Int Immunol*, 15:59-69, 2003.

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

Silveira, A. M., G. Gazzinelli, e cols Human *Schistosomiasis mansoni*: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon gamma and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. v. 98, n. 9, p. 514-9. 2004.

Simpson AJ, Hagan P, Hackett F, Omer Ali P, Smithers SR. Epitopes expressed on very low Mr *Schistosoma mansoni* adult tegumental antigens conform to a general pattern of life-cycle cross-reactivity. *Parasitology*, 100 Pt 1:73-81, 1990.

Soares G, Barral A, Costa JM, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol*, 79:36-39, 2006.

Solbach W, Bodendorfer B, Greil J, Röllinghoff M. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988 Nov;83 Suppl 1:407-10. The role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the pathogenesis of experimental murine leishmaniasis.

Solbach W., Laskay T., The host response to *Leishmania* infection, *Adv. Immunol*. 74 (2000) 275–317.

Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, Don TA, McManus DP, Correa-Oliveira R, Loukas A. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med*, 12:835-840, 2006.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *Journal of Infectious Diseases* 186: 1829-1834, 2002.

van der Kleij D., Latz E., Brouwers J. F., Kruize Y. C., Schmitz M., Kurt-Jones E. A., Espevik T., de Jong E. C., Kapsenberg M. L., Golenbock D. T., Tielens A. G. and Yazdanbakhsh M. (2002) A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 277, 48122-9.

van der Kleij D., van den Biggelaar A. H., Kruize Y. C., Retra K., Fillie Y., Schmitz M., Kremsner P. G., Tielens A. G. and Yazdanbakhsh M. (2004) Responses to Toll-like receptor ligands in children living in areas where schistosome infections are endemic. *J Infect Dis* 189, 1044-51.

Velupillai, P., E. A. dos Reis, e cols Lewis(x)-containing oligosaccharide attenuates schistosome egg antigen-induced immune depression in human schistosomiasis. *Hum Immunol*. v. 61, n. 3, p. 225-32. 2000.

Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1:405-413, 1994.

WHO/TDR (2002). Strategic Direction for Research: Schistosomiasis.

Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, Wong SC. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and non-classical human monocyte subsets. *Blood*, 118:e16-31, 2011.

Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*, 53:41-57, 2012 .

Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*, 16:1643-1656, 2004.

Zaccone, P., Z. Fehervari, et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur J Immunol*. v. 33, n. 5, p. 1439-49. 2003.

Zhang JY, Zou ZS, Huang A, Zhang Z, Fu JL, Xu XS, Chen LM, Li BS, Wang FS. Hyper-activated pro-inflammatory CD16 monocytes correlate with the severity of liver injury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One*, 6:e17484, 2011.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116:e74-80, 2010.

Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*, 81:584-592, 2007.

Zouain, C. S., P. L. Falcao, T. S. Goes, M. F. Leite and A. M. Goes (2004). "*Schistosoma mansoni* PIII antigen modulates in vitro granuloma formation by regulating CD28, CTLA-4, and CD86 expression in humans." *Immunol Lett* 91(2-3): 113-8.

Zouain, C. S., S. Gustavson, S. C. Oliveira, V. Azevedo, J. B. Alves and A. M. Goes (2001). "The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in *Schistosoma mansoni* P24-immunized mice." *Vaccine* 19(9-10): 11218-24.

## ANEXOS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAR DO ESTUDO

**Nome do Projeto:** Avaliação da capacidade de antígenos do *Schistosoma mansoni* em modular a resposta de monócitos e linfócitos de indivíduos com leishmaniose cutânea

**Investigador Principal:** Maria Ilma Andrade Santos Araújo, Médica, Serviço Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos – UFBA, Rua João da Botas s/n, Canela, CEP 40.110-160, Salvador-BA

**Nome do Paciente:** \_\_\_\_\_

#### **Convite e Objetivo:**

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar se produtos do verme *Schistosoma mansoni* são capazes de prevenir a inflamação que causa a leishmaniose. Esta participação implica na sua concordância em submeter-se, periodicamente, durante um ano, aproximadamente, a exames para determinar a presença de leishmaniose, que consistem em: responder a um questionário com perguntas sobre essas doenças, submeter-se a exames clínicos, além da coleta de amostras de sangue e de amostras de fezes.

Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico.

#### **Participação Voluntária:**

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se

retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que lhe será prestada.

**Finalidade do estudo:**

Este estudo tem a finalidade de avaliar se proteínas do *S. mansoni* são capazes de prevenir o desenvolvimento de leishmaniose.

**Procedimentos:**

Caso concorde em participar do estudo, você receberá os frascos coletores de fezes, que deverão ser devolvidos, para que possamos realizar os exames parasitológicos. Em seguida, você doará 40mL de sangue venoso, que será coletado por profissional capacitado para tal, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis.

**Duração do Estudo:** Após a assinatura do termo de consentimento, sua participação no estudo terá uma duração máxima prevista de 6 meses.

**Confidencialidade:**

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

**Análise dos Riscos e Benefícios:**

A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve e sangramento após retirada da agulha. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados por profissionais devidamente habilitados.

**Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:**

Estudos que contribuem para identificação dos mecanismos envolvidos na proteção da leishmaniose por produtos do *S. mansoni* podem levar ao desenvolvimento de novos tratamentos para estas doenças.

As pessoas que se submeterem aos exames receberão se desejarem, os resultados dos mesmos. No caso de detectarmos a presença de parasitas intestinais e leishmaniose você será tratado gratuitamente.

**Custos:**

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

**Esclarecimentos:**

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam desse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dra. Maria Ilma Araujo, coordenadora do projeto, médica do Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, João das Botas, s/n – Canela, telefone (071) 3237-7353, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira, na pessoa do Dr. Antônio Barata, no endereço Rua Padre Feijó, 240 – Canela, telefone (071) 3203-2740.

**Consentimento:**

Se você leu o consentimento livre e esclarecido ou este lhe foi explicado e você concorda em participar voluntariamente deste estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário.

---

Assinatura do Participante ou Responsável

---

Assinatura do Pesquisador

Local: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ e Hora: \_\_\_\_\_

**ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCL para menores****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE IDADE (MENORES DE 18), PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE**

**Projeto:** Avaliação da capacidade de antígenos do *Schistosoma mansoni* em modular a resposta de monócitos e linfócitos de indivíduos com leishmaniose cutânea

**Investigador Principal :** Maria Ilma Andrade Santos Araújo, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia- Brazil.

**Comitê de Ética:** Maternidade Climério de Oliveira/UFBA-Rua Padre Feijó 240, Ambulatório Magalhães Neto, 3<sup>o</sup> andar, Canela-Salvador-Bahia. Tel: 71-3203-2740

**Nome do paciente:** \_\_\_\_\_

**Número de Identificação no Projeto:** \_\_\_\_\_

**Convite e objetivo:** Você está sendo convidado a participar de um estudo científico. O propósito deste estudo é avaliar se substâncias do verme *Schistosoma mansoni* são capazes de prevenir a inflamação que causa a leishmaniose. As principais doenças que nós estudaremos serão a leishmaniose e a esquistossomose, mas nós daremos atenção a outras infecções.

Nós perguntaremos a você sobre a sua saúde. Um médico fará exame físico em você. Isto não causará dor em você. Em seguida iremos solicitar amostra de fezes para avaliar a possibilidade de estar com alguma verminose. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de quatro colheres de sopa) de seu braço usando uma seringa e agulhas descartáveis para realizar alguns exames que ajudarão a explicar a doença. Nós esperamos através deste estudo esclarecer mais sobre esta doença, entendê-las e assim poderemos preveni-las no futuro.

Você pode não participar deste estudo, caso não queira. Se você aceita participar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.

---

Assinatura ou impressão do paciente	Data	Hora
-------------------------------------	------	------

---

Assinatura ou impressão do responsável	Data	Hora
--	------	------

---

Testemunha	Data	Hora
------------	------	------

### COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

---

Assinatura do pesquisador	Data	Hora
---------------------------	------	------