



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

**Curso de Pós-Graduação em Imunologia**

**Dissertação de Mestrado**

**CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE  
*Leishmania braziliensis* E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA  
IMUNE EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR**

**JOSIANE SILVA MARTINS CARVALHO**

**Salvador – Bahia  
2004**

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

**Curso de Pós-Graduação em Imunologia**

**CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE  
*Leishmania braziliensis* E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA  
IMUNE EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR**

**JOSIANE SILVA MARTINS CARVALHO**

**Profa. Orientadora: Dra. Márcia Tosta Xavier**

Dissertação apresentada para  
obtenção do grau de Mestre  
em Imunologia

Salvador – Bahia  
2004

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

Carvalho, Josiane Silva Martins  
C331c Caracterização de frações antigênicas de *Leishmania braziliensis* e  
avaliação da resposta imune em pacientes com Leishmaniose Tegumentar  
[manuscrito]. / Josiane Silva Martins Carvalho. - 2004.  
89 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Ciências da Saúde, 2004.

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Tosta Xavier, Serviço de Imunologia

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Leishmaniose. 3. Antígenos.

I. Título.

CDU 616.993.161:578.74

Aos meus pais, a Fernando e  
às minhas irmãs, essenciais para o meu  
crescimento pessoal e profissional.

## **Agradecimentos**

- À Professora Dra. Márcia Tosta Xavier, pela sua orientação correta, responsável pela minha formação como pesquisadora;
- Ao Professor Dr. Edgar Marcelino de Carvalho, chefe do Serviço de Imunologia do HUPES, por me dar a oportunidade de desenvolver esta pesquisa neste laboratório, bem como pela colaboração dispensada durante o desenvolvimento deste trabalho;
- Aos Professores Dr. Roque Pacheco Almeida e Dra. Amélia Ribeiro de Jesus, pelas incontáveis sugestões e pela grande colaboração nas diversas etapas deste trabalho;
- Aos Professores Dr. Paulo Machado e Dr. Albert Schriefer, pelas colaborações em momentos importantes e cruciais para a continuação do trabalho;
- À Professora Dra. Olívia Bacelar, pela sua paciência, competência e grande ajuda em momentos importantes;
- À equipe médica que estabelece um elo entre os pacientes e o grupo de pesquisa, por sua atuação em Corte de Pedra, em especial ao Dr. Luís Henrique;
- A todos os colegas do Serviço de Imunologia, em especial a: Andréa Magalhães, Angela Giudice, Rosana, Tânia, Luciane, Taís, Paulo Leopoldo, Sara, Lucas, Seth O'Neal, Léa, Márcia;
- À equipe do Serviço de Imunologia, em especial: Glória Orge, Kátia, Dra. Silvane;
- Ao grupo de apoio do Serviço de Imunologia: Lúcia, Elbe, Cristiano, Orlando, Dilma, Lago, Clenildo, Balbina;
- Ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Imunologia ICS/UFBa, em especial aos professores: Songeli Freire, Cláudia Brodskyn, Roberto Meyer, Aldina Barral;

- Aos colegas discentes do curso de Pós-Graduação em Imunologia ICS/UFBa, em especial a Bruno Paule, Maria Terezita, Naize, Karina, Márcia Brandão;
- À secretária do curso de Pós-Graduação, Dilcéia, pela sua amizade, paciência e atenção a mim dispensadas;
- Às equipes dos laboratórios de Imunogenética (HUPES) e de Imunoparasitologia – LIP e Imunorregulação (FIOCRUZ), por permitirem o meu acesso aos mesmos para a realização de procedimentos essenciais para este trabalho;
- À Dra. Maria Clarice Vasconcelos, chefe da Divisão de Laboratórios da Agropecuária-EBDA, por permitir a utilização de equipamentos em uma das principais etapas desta pesquisa, em tempo, ao Sr. Rudival, funcionário extremamente prestativo, compromissado e cuidadoso;
- Aos Srs. Vanilson e José, funcionários do ICS, prontamente dispostos e empenhados na tentativa de solucionar problemas técnicos e pela amizade a mim dispensada;
- Ao meu esposo, Fernando, a quem eu tenho grande admiração e respeito como pessoa. Por nossas longas conversas, pelo seu ombro largo permanentemente receptivo e pelas colaborações enquanto pesquisador;
- Aos meus pais Josias e Natalice pelo esforço, dedicação e estímulo para a realização dos meus objetivos e pela compreensão nos momentos de ausência;
- Às minhas irmãs Jôse e Natalie, pela convivência, paciência e compreensão nos momentos de ausência;
- Aos meus sogros Luzia, Nelson e aos cunhados Marcelo, Cássio e Daniela, pela convivência respeitosa e pelo companheirismo e paciência;
- A todos os amigos que, de alguma forma puderam contribuir para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal.

## ÍNDICE

### LISTA DE ABREVIATURAS

### RESUMO

### ABSTRACT

### INTRODUÇÃO 14

#### 1. A LEISHMANIA 14

#### 2. A LEISHMANIOSE 15

#### 3. IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR 19

#### 4. ANTÍGENOS DE LEISHMANIA 20

### OBJETIVO GERAL 32

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32

### JUSTIFICATIVA 33

### MATERIAIS E MÉTODOS 34

#### 1. PACIENTES E CONTROLES SADIOS 34

#### 2. MICROORGANISMO 34

#### 3. OBTENÇÃO DO EXTRATO 35

#### 4. FRACIONAMENTO DO EXTRATO 36

#### 5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS 36

#### 6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 36

#### 7. WESTERN BLOTTING 37

#### 8. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE 38

##### PERIFÉRICO (CMSP)

#### 9. PRODUÇÃO DE CITOCINAS 39

10. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS FRAÇÕES	39
11. DOSAGEM DAS CITOCINAS	40
ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
ESQUEMA GERAL DA METODOLOGIA	42
<b>RESULTADOS</b>	44
1. FRACIONAMENTO DO EXTRATO	46
1.1. CROMATOGRAFIA	46
1.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	48
2. WESTERN BLOTTING	50
3. PRODUÇÃO DE CITOCINAS	52
3.1. IFN- $\gamma$	52
3.2. TNF- $\alpha$	56
3.3. IL-10	60
<b>DISCUSSÃO</b>	64
<b>CONCLUSÕES</b>	76
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	77



## ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1: Dados dos pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa	45
FIGURA 1: Cromatografia em coluna de Bio-Gel P 60 do extrato total de <i>L. braziliensis</i>	47
FIGURA 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida do extrato total e frações de <i>L. braziliensis</i>	49
FIGURA 3: Western blotting do extrato total e frações de <i>L. braziliensis</i>	51
TABELA 2: Produção in vitro de IFN- $\gamma$ pelas CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar, com as frações V e VI de <i>L. braziliensis</i>	54
FIGURA 4: Produção in vitro de IFN- $\gamma$ pelas CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar, com as frações V e VI de <i>L. braziliensis</i>	55
TABELA 3: Produção in vitro de TNF- $\alpha$ pelas CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar, com as frações V e VI de <i>L. braziliensis</i>	58
FIGURA 5: Produção in vitro de TNF- $\alpha$ pelas CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar, com as frações V e VI de <i>L. braziliensis</i>	59
TABELA 4: Produção in vitro de IL-10 pelas CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar, com as frações V e VI de <i>L. braziliensis</i>	62
FIGURA 6: Produção in vitro de IL-10 pelas CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar, com as frações V e VI de <i>L. braziliensis</i>	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito-monócito
HSP	Proteínas de choque térmico ou “heat-sock proteins”
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL-10	Interleucina 10
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
KMP-11	Proteína de membrana do cinetoplasto de 11 KDa
LACK	Proteína de <i>Leishmania</i> homóloga ao receptor humano para a quinase c ativada
LCD	Leishmaniose cutâneo difusa
LCDi	Leishmaniose cutâneo disseminada
LCL	Leishmaniose cutâneo-localizada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral ou Kala-azar
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
gp 63	Glicoproteína de 63 KDa
SLA	Antígeno solúvel de leishmania

STAT	Sinais transdutores e ativadores de transcrição
TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento – beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa

## RESUMO: CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE *Leishmania braziliensis* E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

*Leishmania braziliensis* é um dos principais causadores da leishmaniose tegumentar americana (LTA), doença endêmica na região de Corte de Pedra - Bahia, Brasil e em aproximadamente 88 países em todo o mundo, com maior concentração em áreas tropicais e subtropicais. Diversos estudos foram realizados empregando antígeno solúvel de leishmania (SLA), porém poucos relatam sobre antígenos de *L. braziliensis*, nativos ou recombinantes. São descritos na literatura antígenos de elevado peso molecular, o lipofosfoglicano (LPG) de membrana, moléculas de 72, 63, 46, 30, 20 e 11 KDa, além de histonas e heat-shock proteins (HSP).

O presente trabalho teve como objetivos fracionar SLA de promastigotas de *L. braziliensis* e caracterizar as respostas imunológicas humoral e celular induzidas. Foram utilizados promastigotas cultivados em meio Schneider. O extrato total após sonicação, foi submetido à cromatografia em coluna de Bio-Gel P-60 e as frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e revelado com nitrato de prata. A reatividade humoral foi determinada por immunoblotting empregando plasma de pacientes com leishmaniose cutânea. A partir dos resultados obtidos, foram selecionadas duas frações: F-VI: 64 KDa e F-V: 64, 47, 32 e 19 KDa, com as quais foi realizado o estudo da resposta celular. A medida da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10) por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 15 pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e 5 pacientes com leishmaniose mucosa (LM) foi determinada pelo método de ELISA.

Foram obtidos os seguintes resultados: para LC: IFN- $\gamma$ : 180,0 $\pm$ 233,2 pg/mL (F-VI) e 611,6 $\pm$  603,4 pg/mL (F-V) ( $p=0,0164$ ); TNF- $\alpha$ : 793,9 $\pm$ 555,6pg/mL (F-VI) e 780,3 $\pm$ 739,7 pg/mL (F-V) ( $p>0,05$ ) e IL-10: 54,6 $\pm$ 63,5 pg/mL (F-VI) e 35,9 $\pm$ 38,8 pg/mL (F-V) ( $p>0,05$ ). Para os pacientes com LM: IFN- $\gamma$ : 69,2  $\pm$  64,9 pg/mL (F-VI) e 389,0 $\pm$ 612,6 pg/mL (F-V) ( $p>0,05$ ); TNF- $\alpha$ : 583,1 $\pm$ 637,4 pg/mL (F-VI) e 552,2 $\pm$ 589,2 pg/mL (F-V) ( $p>0,05$ ) e IL-10: 22,3 $\pm$ 24,0 pg/mL (F-VI) e 30,9 $\pm$ 50,6 pg/mL (F-V) ( $p>0,05$ ).

CMSP de pacientes com LC foram estimuladas a produzir altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e baixos níveis de IL-10, especialmente pela FÇ-V. Nas CMSP dos pacientes com LM, houve alta produção das citocinas de resposta Th1, porém sem diferença estatisticamente significativa, além de uma discreta produção de IL-10. A avaliação da correlação mostrou que nas CMSP dos pacientes LM estimuladas pela FÇ-V, o IFN- $\gamma$  produzido favoreceu significativamente a produção de TNF- $\alpha$  ( $p=0,037$ ). A reação sorológica revelou que apenas os plasmas dos pacientes com LC reconheceram as moléculas de 64, 32 e, mais fracamente, 19 KDa. Esses dados sugerem uma provável participação ativa destas moléculas na indução da resposta à leishmaniose e que, em LM a associação destes antígenos pode contribuir para o aumento da lesão, enquanto que nos pacientes LC esta associação pode ter um efeito imunoprotetor.

Palavras-chave: *L. braziliensis*, leishmaniose, antígenos, resposta celular.

**ABSTRACT: Characterization of *Leishmania braziliensis* antigenic fractions and their immune response in patients with tegumentary leishmaniasis**

*Leishmania braziliensis* is one of the most important causative agents of American tegumentary leishmaniasis (ATL), an endemic disease in Corte de Pedra, Bahia, Brazil, and in almost 88 other subtropical and tropical countries. Many studies about antigen characterization have been done with soluble leishmania antigens (SLA), but few of them involved native or recombinant *L. braziliensis* antigens. Some molecules have been described in the literature: high molecular weight antigens, membrane lipophosphoglycan (LPG), 72, 63, 46, 30, 20, and 11 KDa, as well as histones and heat-shock proteins (HSP).

The aim of this study was to fractionate *L. braziliensis* promastigote antigens, and characterize their role in induce cellular and humoral responses. For these purposes, promastigotes obtained from a cutaneous leishmaniasis patient lesion were cultivated in Schneider medium. The extract obtained by sonication was submitted to chromatography using Bio-Gel P-60 column. Fractions were analyzed by electrophoresis using 10% polyacrylamide, and revealed by silver nitrate. The immunoblotting was done using plasmas from cutaneous leishmaniasis patients. We selected two fractions: F-IV: 64 KDa, and F-V: 64, 47, 32, and 19 KDa, which we used to study cellular immune response. Cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10) produced by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 15 cutaneous patients (CL) and 5 mucous patients (MC) were evaluated by ELISA method.

The results were: For LC patients: IFN- $\gamma$ : 180,0 $\pm$ 233,2 pg/mL (F-VI) and 611,6 $\pm$  603,4 pg/mL (F-V) ( $p=0,0164$ ); TNF- $\alpha$ : 793,9 $\pm$ 555,6 pg/mL (F-VI) and 780,3 $\pm$ 739,7 pg/mL (F-V) ( $p>0,05$ ) and IL-10: 54,6 $\pm$ 63,5 pg/mL (F-VI) and 35,9 $\pm$ 38,8 pg/mL (F-V) ( $p>0,05$ ). For LM patients: IFN- $\gamma$ : 69,2 $\pm$ 64,9 pg/mL (F-VI) and 389,0 $\pm$ 612,6 pg/mL (F-V) ( $p>0,05$ ); TNF- $\alpha$ : 583,1 $\pm$ 637,4 pg/mL (F-VI) and 552,2 $\pm$ 589,2 pg/mL (F-V) ( $p>0,05$ ) and IL-10: 22,3 $\pm$ 24,0 pg/mL (F-VI) and 30,9 $\pm$ 50,6 pg/mL (F-V) ( $p>0,05$ ).

PBMC from CL produced high levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and low levels of IL-10, especially when induced by F-V. In PBMC cultures from ML patients, high levels of Th1 cytokines were also produced, but no statistical difference was observed, and IL-10 production was discretely observed. In this group of patients, the correlation analysis showed that in mononuclear cells stimulated by F-V, IFN- $\gamma$  contributed significantly to TNF- $\alpha$  production ( $p=0,037$ ). The serologic reaction revealed that CL plasmas recognized the 64, 32 and, more weakly, 19 KDa proteins. These data suggest a probable active participation of these molecules in inducing cellular response to Leishmaniasis. Furthermore, in ML, this antigen association may contribute to tissue damage and a worst lesion, while in CL this cooperation could be immunoprotective.

Key-words: *L. braziliensis*, leishmaniasis, antigens, cellular response.

## INTRODUÇÃO

### 1. A LEISHMANIA:

O gênero *Leishmania* é composto por parasitas tripanosomatídeos causadores de diferentes tipos de leishmaniose. Estes microorganismos podem se apresentar na forma amastigota, aflagelada, medindo de 2 a 5  $\mu\text{m}$ , que sobrevive no fagolisossoma de células mononucleares do hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas apresentam flagelo e estão localizadas dentro do inseto transmissor. Elas podem ser procíclicas, formas com capacidade multiplicativa, encontradas presas à mucosa intestinal do inseto e formas metacíclicas infectantes, as quais são encontradas na cavidade oral e probócida do inseto vetor. (HEPBURN, 2000).

São parasitas digenéticos com um ciclo evolutivo que se inicia quando as formas amastigotas são ingeridas pela fêmea do vetor flebotomíneo durante o seu repasto sanguíneo. Uma vez estando no intestino do inseto, o parasita sofre uma série de alterações morfológicas e funcionais (KILLICK-KENDRICK, 1990; SACKS, 1989), se transformando em promastigota procíclico que pode ser encontrado livre ou ligado a microvilosidade intestinal (ALMEIDA, et al., 2003). Em seguida, as formas procíclicas se transformam em promastigotas metacíclicos e são levadas para a região bucal do inseto. No momento da alimentação até  $10^3$  protozoários são inoculados na região intradérmica do hospedeiro mamífero juntamente com a saliva do flebótomo. As formas metacíclicas são interiorizadas

pelas células do sistema fagocitário e confinadas em fagossomas, se transformando em amastigotas. Ocorre formação do fagolissossoma, onde as amastigotas se reproduzem, podendo romper o macrófago e serem liberadas e podendo ser fagocitadas por outras células ou ingeridas por outro flebotomíneo durante nova alimentação, fechando o seu ciclo de vida.

## **2. A LEISHMANIOSE:**

### **2.1. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

A leishmaniose é um complexo de manifestações clínicas que acometem o hospedeiro vertebrado subsequente à entrada do parasita no organismo e ao envolvimento de eventos moleculares e celulares, como tentativa de debelar este protozoário. Tais manifestações abrangem um amplo espectro e dependem da complexa associação entre as espécies infectantes, as condições genéticas e imunológicas do hospedeiro, além de variações ambientais.

Dentre as características do espectro da leishmaniose tegumentar, o paciente poderá desenvolver a forma cutânea localizada (LCL), com o desenvolvimento local de uma lesão ulcerada com bordas elevadas, medindo entre 0,5 a 3 cm de diâmetro. Em alguns casos não complicados, a própria resposta imune do paciente pode eliminar a infecção e a lesão cicatrizar espontaneamente, não sendo necessário o tratamento medicamentoso (CARVALHO, et al., 1995).

De acordo com BACELLAR, e colaboradores, 2002, aproximadamente 3% dos pacientes LCL podem desenvolver a forma mucocutânea (LMC), com comprometimento de cavidade nasal e bucal, destruição dos tecidos cartilagosos, com aspecto desfigurante dos lábios, nariz, palatos, podendo atingir faringe, laringe e cordas vocais, com rouquidão e enfraquecimento da voz (GUERREIRO, et al., 2000) .

Uma terceira e rara manifestação é a leishmaniose cutânea difusa (LCD), doença com caráter anérgico, de difícil tratamento e diagnosticada no Brasil não mais do que 1 a 2 casos por ano. O paciente apresenta lesões nodulares superficiais não ulceradas em várias regiões do corpo, desencadeadas pela disseminação do parasita. Os nódulos associados com infiltrações cutâneas apresentam macrófagos ricos de amastigotas em seu interior (TURETZ, et al., 2002) e podem ser confundidos com hanseníase virchowiana, além de serem resistentes ao tratamento (PEARSON & SOUSA, 1996).

Em outra manifestação, o paciente pode desenvolver a leishmaniose cutânea disseminada (LCDi), que correspondeu a cerca de 0,2% dos casos de leishmaniose cutânea no Brasil na década de 70 (TURETZ, et al, 2002). Esta doença se caracteriza por múltiplas lesões pleomórficas, geralmente ulceradas (no mínimo 10, podendo chegar a centenas) distribuídas em pelo menos 2 áreas não vizinhas do corpo e geralmente respondem bem ao tratamento (CARVALHO, et al., 1994).

As espécies do parasita podem ser agrupadas de acordo com o tipo de manifestação clínica que desencadeiam ou com a sua distribuição no mapa global. As espécies dermatrópicas são: *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L.*



*amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L.V. guyanensis*, *L.V. panamensis*, sendo as três primeiras mais frequentemente encontradas nas regiões do “Velho Mundo” (Leste Europeu, Sudeste da Ásia e regiões da África) e as demais, no chamado “Novo Mundo”. A *L. braziliensis* está relacionada às formas LCL, LMC e LCDi (FUNASA, 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

## **2.2. EPIDEMIOLOGIA**

São aproximadamente 21 espécies e subespécies causadoras da leishmaniose (SACKS & KAMHAWI, 2001; CUNNINGHAM, 2002). Estima-se que a leishmaniose seja endêmica em aproximadamente 88 países de clima tropical e sub-tropical, distribuídos em todos os continentes, nos quais tem notificação compulsória em apenas 30 (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Nestes, há cerca de 12 milhões de casos, com uma incidência anual de 1,5 a 2 milhões, dos quais 400 mil apresentam a forma visceral. Em todo o mundo, estima-se que 350 milhões de pessoas estejam vivendo sob risco de adquirir a leishmaniose.

No Brasil, a incidência da leishmaniose tegumentar vem aumentando principalmente nas regiões Sudeste, Nordeste, Centro-Oeste e a região Amazônica. Dados registrados até 1999 contam com uma incidência média anual de 35 mil casos da forma tegumentar (GONTIJO & CARVALHO 2003). Entre 1985 e 1999 foram registrados 388.155 casos autóctones da LTA e o coeficiente de detecção aumentou de  $10,45/10^5$  habitantes para  $18,63/10^5$  habitantes (FUNASA, 2000). De fato, esta é uma das doenças dermatológicas que merece maior atenção, devido a sua magnitude, risco de ocorrência de deformidades no homem,

assim como o envolvimento psicológico do doente, com reflexos nos campos social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional.

### **2.3. DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico é baseado na história epidemiológica, avaliação clínica, positividade da resposta celular tardia após aplicação intradérmica de antígeno total de *Leishmania*, pesquisa de anticorpos para antígenos de leishmania (por imunofluorescência ou ELISA) pesquisa de amastigotas dentro de macrófagos em biópsia ou cultura em meio semi-líquido NNN-LIT do tecido colhido por biópsia.

### **2.4. TRATAMENTO**

O tratamento de escolha para as formas tegumentares da leishmaniose se baseia na antimonial pentavalente glucantime, podendo falhar em até 30% dos pacientes infectados por *L. braziliensis* (SOTO-MANCIPE, et al.,1993). Em casos resistentes ao tratamento, glucantime pode ser associado a anfotericina B (GONTIJO & CARVALHO, 2003), bem como a pentamidina, (FUNASA, 2000).

### 3. IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A resposta imune contra o parasita é eminentemente celular, tendo a resposta humoral uma pequena participação. Os linfócitos Th1 em expansão protegem durante a infecção, enquanto os Th2 exacerbam a doença. A produção de IL-12 pelas células dendríticas e macrófagos promove a diferenciação das células T virgens em Th1 e induz a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T e as matadoras naturais (NK) (KANE & MOSSER, 2000; CUNNINGHAM, 2002). IFN- $\gamma$  estimula macrófagos e linfócitos a produzirem TNF- $\alpha$  e estas duas citocinas estimulam macrófagos quanto à produção de óxido nítrico (NO), considerado o principal produto envolvido com a morte da leishmania (D'OLIVEIRA JÚNIOR, et al., 2002; BACELLAR, et al., 2002).

A expansão Th2, controlada pelo aumento de IL-4, promove suscetibilidade ao parasita, com diminuição da produção de IL-12 e do seu receptor, de IFN- $\gamma$  e inibição da produção de NO pelo macrófago (JONES, et al., 1998). Também, a produção de IL-10, principal citocina reguladora da resposta imune celular tipo Th1, inibe a síntese de IL-12, IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (CARVALHO, et al., 2003).

Linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa possuem capacidade de proliferar quando estimulados com antígeno solúvel de leishmania – SLA (CARVALHO, et al., 1985), apresentando alta produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , demonstrando um predomínio de resposta do tipo Th1 CD4<sup>+</sup>. BACELLAR, et al., 2002 e LEOPOLDO, et al., 2003 mostraram que linfócitos de pacientes com a forma mucosa produzem exageradamente estas citocinas pró-inflamatórias em

relação aos pacientes com leishmaniose cutânea; ao contrário, a produção de IL-10 é muito pequena em ambas as manifestações. Pacientes com lesão cutânea inicial apresentam uma depressão transitória da resposta Th1, caracterizada pela ausência da resposta tardia à intradermoreação e da produção de IL-12, baixos níveis de IFN- $\gamma$ , altas dosagens de IL-10 e elevada expressão de mRNA para esta citocina (ROCHA, et al., 1999), o que permite a sobrevivência e multiplicação do parasita e favorece a evolução para a doença.

#### **4. ANTÍGENOS DE LEISHMANIA**

A complexa constituição molecular das leishmanias interagindo com os componentes celulares do hospedeiro nos processos de penetração no macrófago e permanência em seu interior, evasão dos mecanismos leishmanicidas, assim como a resposta imune induzida demonstram que esses protozoários apresentam características evolutivamente relevantes para a perpetuação do seu ciclo de infecções.

Diversos componentes moleculares de *Leishmania*, isolados ou recombinantes, vêm sendo avaliados funcional e antigenicamente. Dentre estes compostos, o lipofosfoglicano (LPG), gp 63, LACK, gp 46, KMP-11, hsp-70 - 80, H2A, predominam na literatura.

#### 4.1. LIPOFOSFOGLICANO (LPG):

A superfície celular de todos os tripanossomatídeos apresenta proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (difosfoheptassacarídeo conservado contendo unidades de fosfodissacarídeo carreando cadeias laterais espécie-específicas) e glicolipídios-GPI livres que formam uma camada protetora e são importantes intermediários de interações parasita-hospedeiro. Ao contrário dos eucariotas superiores, a membrana celular desta família é ricamente composta pelas proteínas ancoradas por GPI (ILGOUTZ & McCONVILLE, 2001).

LPG são fosfolipídios complexos, macromoléculas abundantes nos promastigotas (aproximadamente  $6 \times 10^6$  cópias/ célula), principalmente nos metacíclicos (McCONVILLE & BLACKWELL, 1991). LPG está ligado à membrana através de GPI do tipo-2 (contendo unidades de  $\text{Man}\alpha(1-3)\text{Man}\alpha(1-4)\text{GlcN}\alpha(1-6)\text{PI}$ ) e apresenta uma estrutura básica contendo unidades repetidas de  $-6\text{Gal}\beta 1,4\text{Man}\alpha 1-\text{PO}_4^-$ , podendo apresentar substituições por polissacarídeos em posições definidas da galactose ou manose, de acordo com a espécie do parasita (SACKS & KAMHAWI, 2001). Sua composição e tamanho molecular variam de acordo com a fase evolutiva do parasita, o que reflete nas suas funções relacionadas à capacidade de fixação às microvilosidades intestinais do inseto vetor, proteção contra a lise e interação com receptores celulares no hospedeiro. Na forma procíclica, unidades de manose do LPG interagem com lectinas presentes na superfície intestinal do flebotomíneo. Na forma metacíclica infectante, LPG duplica sua cadeia e apresenta resíduo de arabinose terminal, que impede a

interação com galactose (McCONVILLE, et al, 1992). Também ocorre variação na composição de açúcares variando a interação intestinal e favorecendo que o protozoário migre para a cavidade bucal do inseto. Além disso, LPG confere maior espessura à membrana do protozoário, dado que dificulta a ativação da C<sub>5</sub> convertase, assim como a inserção e fixação do complexo de ataque à membrana, MAC (C<sub>5</sub>-C<sub>9</sub>), protegendo o protozoário da citólise mediada pelo complemento no hospedeiro (SACKS & SHER, 2002). Na superfície dos macrófagos, proteínas ligadoras de manose (MBP), receptor de proteína C reativa, receptor tipo 3 (CR3) do complemento podem interagir com LPG. Assim, através destas vias, e associada à participação de gp 63, o protozoário realiza a endocitose mediada pelo receptor (CUNNINGHAM, 2002; BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1998).

O LPG também pode retardar a formação do fagolisossoma altamente ácido (normalmente efetivada em 30 minutos, aproximadamente), e eficientemente neutraliza os radicais hidroxila e ânions superóxido liberados após a ativação da NADPH oxidase, provavelmente favorecendo a geração de amastigotas mais resistentes às hidrolases intravacuolares (DERMINE, et al, 2000). Através da interação com íon cálcio, diacilglicerol ou fosfolipídios, LPG pode inibir a proteína quinase C (PKC), importante para as funções de ativação da via oxidativa e transdução de sinal via JAK1, JAK2 (Janus quinases) e STAT1 (sinais transdutores e ativadores de transcrição-1) nos macrófagos, em resposta a IFN- $\gamma$  (CUNNINGHAM, 2002). Estudos de PONTE-SUCRE, et al, 2001, demonstraram que LPG obtida a partir de promastigotas de *L. major*, por extrações orgânicas sucessivas e cromatografia em coluna de octil-sefarose, induziu o aumento da

expressão de CD 25 (receptor  $\alpha$  de IL-2), favorecendo a maturação das células de Langerhans, mas também foi capaz de alterar a expressão das moléculas de adesão (VE-caderina e CD-31), inibindo a migração destas células, provavelmente conferindo à leishmania mais um mecanismo de escape da ação imunoestimulatória deste tipo celular.

Estudos demonstram que LPG provoca inibição da transcrição de IL-12p40 (reconhecido como importante ativador de células NK e indutor da diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> para o tipo Th1), mas não suprime a expressão do gene do TNF (importante para a atração de complemento). BECKER, et al., 2003, mostraram que LPG purificada a partir de promastigota metacíclico de *L. major* é capaz de induzir significativamente o aumento da expressão de Toll-like receptor-2 na superfície celular e seu mRNA em células NK isoladas, diferente da LPG purificada das formas procíclicas. Neste mesmo estudo, altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram detectados nos sobrenadantes das culturas de NK e esta indução era suprimida após pré-incubação do LPG com fragmento F(ab')<sub>2</sub> de anticorpo monoclonal anti-LPG. Outra importante ação inibitória do LPG ocorre sobre a expressão do gene de IL-1 $\beta$ , importante para a mobilização de proteínas de fase aguda e neutrófilos durante os processos iniciais da infecção (CUNNINGHAM, 2002).

#### 4.2. LEISHMANOLISINA (MSP ou gp 63):

A principal zinco ecto-metaloprotease, é uma glicoproteína de 60-63 KDa ligada ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), fosfolípido ancorado à membrana da leishmania. A gp 63 pertence à família de peptidase M8. Esta molécula representa aproximadamente 1% das proteínas totais de promastigota, com uma estimativa de  $5 \times 10^5$  moléculas/célula, estando presente nas formas amastigota e promastigota, porém mais abundante na forma metacíclica do que na procíclica e apresentando elevada identidade da sua seqüência entre as espécies. São conhecidas aproximadamente 24 seqüências gênicas para esta proteína entre as espécies de leishmania, geralmente diferindo em suas regiões codificadoras C-terminais, regiões 3' não traduzidas ou expressão diferenciada de acordo com a etapa do ciclo vital. Seqüências peptídicas contendo resíduos de cisteína são conservadas entre as espécies e, em *L. major*, foi demonstrado que estão relacionadas com a atividade desta protease, se ligando ao zinco no sítio ativo e inibindo a atividade enzimática. Foi proposto que este mecanismo protege a célula da auto-destruição pela gp 63 ativa (McDONALD, et al, 1995).

A expressão aumentada desta proteína nos promastigotas durante a passagem da fase logarítmica de crescimento para a estacionária foi notada pela primeira vez em promastigotas de *L. braziliensis* e correlacionada com o aumento da sua virulência (YAO, et al., 2003).

A gp 63 é uma protease capaz de degradar um conjunto amplo de substratos: caseína, gelatina, albumina, hemoglobina e fibrinogênio (YAO, et al.,



2003), com atividade máxima em condições ácidas. Segundo CUNNINGHAM, 2002; CHANG & McGWIRE, 2002, gp 63 também tem a capacidade de degradar enzimas lisossomais, provavelmente favorecendo a sobrevivência dentro das células fagocitárias.

Estudos demonstram a importância da gp63 nos diferentes estágios evolutivos da leishmania. Segundo SACKS & KAMHAWI, 2001, esta proteína não parece influenciar a sobrevivência do protozoário dentro do intestino do inseto vetor. Por outro lado, ela está envolvida com a resistência à citólise mediada pelo sistema complemento pelas vias clássica e alternativa. Segundo JOSHI, et al., 2002, a deleção de genes alvos deriva em mutantes com expressão deficiente desta molécula, apresentando profunda sensibilidade à lise mediada por complemento quando retirado o gen 1 de promastigotas metacíclicos de *L. major*, em relação à forma selvagem. Esta molécula se liga ao C<sub>3</sub> e C<sub>3b</sub> do complemento já nos primeiros momentos, após a sua inoculação pelo inseto vetor no hospedeiro e é capaz de clivá-los e inativá-los, transformando-os em C<sub>3bi</sub>. Este componente funciona como uma opsonina para a leishmania e facilita a sua ligação aos receptores para complemento tipos 1 e 3 (CR<sub>1</sub>, CR<sub>3</sub>) na membrana do macrófago. Assim, gp 63, juntamente com LPG, favorece a evasão do complexo de ataque à membrana (C<sub>5</sub>-C<sub>9</sub>) e ainda aproveita os receptores CR1 e 3 para uma “entrada silenciosa” no macrófago (BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1998). Este reconhecimento não promove a ativação da via oxidativa em monócitos (ALEXANDER, et al., 1999).

Estudos de avaliação da resposta celular para gp 63 de *L. amazonensis*, usando células mononucleares de pacientes com leishmaniose cutânea, mucosa e de pacientes tratados da forma visceral, mostraram que esta proteína, nativa ou recombinante, induz a produção de IFN- $\gamma$  e não induz a produção de IL-4, citocina importante para a imunomodulação da infecção. Avaliando-se a proliferação celular, observou-se que fenótipos de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> estão igualmente presentes. Assim, a gp 63 pode funcionar como um forte imunógeno para as células T humanas (RUSSO, et al., 1991). Neste mesmo estudo, reação sorológica avaliada por immunoblotting evidenciou que gp 63 é fortemente reconhecida após reação com soro de coelho contendo anticorpos policlonais.

#### **4.3. PROTEÍNA DE *LEISHMANIA* HOMÓLOGA AO RECEPTOR HUMANO PARA A QUINASE C ATIVADA (LACK):**

Proteína altamente conservada do gênero *Leishmania*, com 36 KDa, correspondendo a aproximadamente 0,03% das proteínas totais (MAASHO, et al., 2000; ANTONELLI, et al., 2004). Em experimentos com camundongos suscetíveis a *L. major*, LACK está associada ao aumento de IL-4, citocina que inibe a indução dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  mediada por IL-12 (LAUNOIS, et al., 1998). Estudos feitos com linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea, quando cultivados em presença de rLACK obtido de *L. major*, demonstram que são fortemente induzidos quanto à produção de IL-10, o que provoca a inibição de

monócitos produtores de TNF-  $\alpha$  (ANTONELLI, et al., 2004). BOURREAU, et al., 2002 observaram que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com leishmaniose cutânea por *L. guyanensis* produzem IFN- $\gamma$  em resposta a LACK até 30 dias após o desenvolvimento da lesão, enquanto que IL-10 permanece detectada independente do tempo. Este estudo sugere que a IL-10 produzida atue sobre os monócitos produtores de TNF- $\alpha$ , com efeitos funcionais, tais como destruição do parasita e/ou apresentação de antígeno menos eficiente. BOURREAU, et al., 2003, estudando a resposta *in vitro* e frequência celular de CMSP de soldados franceses sem história prévia de leishmaniose, observaram que células T CD4<sup>+</sup> apresentaram produção precoce e aumentada de IFN- $\gamma$  em resposta a LACK , sugerindo que estas podem ser empregadas como marcadores imunológicos precoces de exposição à leishmania. Tem sido sugerido que a proteína LACK contenha um epitopo imunodominante que represente o alvo de respostas imunes iniciais (REQUENA, et al., 2000), provavelmente envolvendo elementos inatos da imunidade (MAASHO, et al., 2000). Neste último estudo, realizado com CMSP de doadores suecos sem história prévia de infecção, os autores relataram elevada produção de IFN- $\gamma$ , IL-10 e elevada expressão dos respectivos mRNAs predominantemente pelas células T CD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e células NK (CD16/56<sup>+</sup>), enquanto que mRNA para IL-10 foi encontrado de forma relevante em células aderentes, os monócitos/macrófagos. Também foi observado que as células NK produzem altos níveis de IFN- $\gamma$  em presença de monócitos/macrófagos e ausência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

#### **4.4. PROTEÍNA DE 78 KDa:**

Isolada da membrana de promastigotas de *L. donovani*, mas também presente em amastigotas, esta proteína purificada foi reconhecida após sorologia utilizando soros de pacientes com a forma visceral e foi capaz de reduzir a parasitemia em camundongos BALB/c previamente imunizados, além de induzir uma produção aumentada de IgG2a e baixos níveis de IgG1 nestes animais (MUKHERJEE, 2002). IgG2a é considerada um isotipo protetor, podendo estar presente em resposta a infecções por parasitas intracelulares, assim como o IFN- $\gamma$  (ALLISON, 1994).

#### **4.5. PROTEÍNA DE MEMBRANA DO CINETOPLASTO (KMP-11):**

Proteína associada ao LPG de membrana do cinetoplasto, com peso de 11 KDa, apresenta ação “downregulatória” da produção de NO em macrófagos infectados, por possuir um análogo estrutural da L-arginina, um inibidor da iNOS (CUNNINGHAM, 2002). Segundo RAMÍREZ, et al., 2002, células mononucleares de baço de camundongos BALB/c, previamente imunizados com cepa transgênica hiper-atenuada de *Toxoplasma gondii* ts-4 expressando esta molécula heteróloga e depois desafiados com promastigotas de *L. major*, produziram elevados níveis de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-4. Em estudos realizados por CARVALHO, et al., 2003, células não aderentes de CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea

estimuladas com rKMP-11 produziram altos níveis de IL-10, demonstrando um efeito modulador de macrófagos e de células Th1.

#### **4.6. HISTONAS:**

Histonas são proteínas conservadas evolutivamente que se associam ao DNA para formar a unidade estrutural da cromatina em núcleo de eucariotas, o nucleossomo. Histona H1 é o nome aplicado para uma família de pequenas proteínas básicas que participam na estabilidade dos nucleossomos e facilitam a formação de estruturas mais complexas da cromatina (CARMELO, et al., 2002). Em 1995, foi descrita a resposta humoral em cães com leishmaniose visceral contra H2A de *L. infantum*. Em seguida, respostas similares para H3, H2B e fragmento de H4 de *L. infantum* foram caracterizadas (REQUENA, et al., 2000). Em estudos de MONTROYA, et al., 1997, observou-se que 58 % dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana reagiram com H2B de *L. peruviana*. Em experimentos de CARMELO, et al., 2002, 66 % de 24 pacientes com leishmaniose cutânea apresentaram reação humoral positiva para H1 recombinante obtida de *L. braziliensis*, sendo esta proteína solubilizada apenas em condições extremamente desnaturantes.

#### 4.7. PROTEÍNAS HEAT-SHOCK (HSP):

Também conhecidas como proteínas de estresse, as HSP têm papel importante na termotolerância, assim como na biossíntese de proteínas e glicoproteínas complexas. As HSP70 são ainda importantes como imunógenos em doenças infecciosas e síndromes autoimunes. De fato, estas proteínas são altamente conservadas, apresentando 50 a 70 % de homologia da seqüência de aminoácidos entre bactérias, fungos, tripanossomatídeos e humanos (JENSEN, et al., 2002). Neste estudo, rGRP78 obtido de amastigota de *L. donovani*, cujo gene é membro da família das HSP70, foi capaz de induzir proliferação de linfócitos T de pacientes infectados com *L. donovani* e *L. major* e apresentou reação sorológica positiva com plasma de pacientes com leishmaniose visceral, cutânea e cutânea pós-kalazar. Estudos anteriores do mesmo autor mostraram que rGRP78 e uma vacina de DNA com o gene GRP78 são capazes de proteger camundongos BALB/c, C57BL/6 e C3H/He da infecção experimental com *L. major* (JENSEN, et al., 2001).

Apesar de serem altamente conservadas, as respostas celulares e humorais são específicas. Assim, soros de pacientes com leishmaniose cutânea reconheceram rHSP60 de *L. major*, ao contrário da HSP60 humana (REY-LANDINO, et al., 1997).

#### **4.8. REAÇÕES SOROLÓGICAS EMPREGANDO ANTÍGENOS DE *Leishmania***

Devido à frequência relativamente baixa de culturas positivas em pacientes infectados, alguns trabalhos vêm sendo realizados para a avaliação sorológica empregando antígenos de leishmania. Estudos de JAFFE, et al., 1990, mostraram que antígenos com pesos moleculares entre 5 e 50 KDa foram reconhecidos por anticorpos presentes no soro de pacientes com a forma ativa de leishmaniose cutânea causada por *L. major*, após reação de western blotting.

Em experimentos de VALLI, 1999, antígenos solúveis de promastigotas de *L. braziliensis*, os quais foram obtidos de lesões de pacientes com as formas cutânea e mucosa, foram empregados para identificar um candidato a imunomarcador para a leishmaniose mucosa. Soros de pacientes com *L. cutânea* reagiram com menos intensidade aos antígenos de 75, 66, e 45 KDa obtidos de paciente com a forma cutânea em relação aos soros de pacientes com a forma mucosa.

Nos estudos realizados por CUBA-CUBA, et al., 2001, anticorpos presentes em soros de pacientes com as formas mucosa e cutânea apresentaram entre si o mesmo perfil de reconhecimento, reagindo com componentes antigênicos de 56, 60, 66, 72, 88 e 110 KDa. Estes autores sugeriram que estes fossem específicos para o subgênero *Viannia*.

Em experimentos realizados por BRITTO, et al., 2001, antígenos de *L. (Viannia) braziliensis* foram empregados para avaliar se a dinâmica da resposta humoral poderia ser útil para monitorar a cura clínica. Deste modo, foi detectada

uma redução da reatividade de IgG para os antígenos estudados, com exceção para o de 19 KDa nos soros de pacientes curados espontaneamente, sugerindo para este componente um papel protetor contra leishmaniose cutânea. Os compostos antigênicos mais freqüentes apresentaram pesos de 27 e 30 KDa e a reatividade dos anticorpos contra estes foi reduzida à metade em pacientes tratados clinicamente, sugerindo um papel de marcador para a cura da leishmaniose cutânea.

Dados de NASCIMENTO, et al., 1990, mostram que antígenos com pesos estimados de 42, 46, 63, 66, 73, 87 97 e 160 KDa presentes na vacina Leishvacin® (BioBrás – Bioquímica do Brasil) são importantes para desenvolver imunidade contra leishmaniose tegumentar. A partir deste dado, CARDOSO, et al., 2003, avaliaram a resposta celular e humoral em camundongos C57BL/10 induzida por estes componentes separados por eletroeluição e observaram que as proteínas de 63, 87 e 160 KDa ofereceram proteção de 57%, valores similares aos observados em camundongos que receberam Leishvacin® total; índice de proteção de 42,86% foi obtido com as proteínas de 46, 66, 73 e 97 KDa e a proteína de 42 KDa ofereceu apenas proteção de 28,57%; houve, contudo baixa produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos esplênicos desses animais, em associação negativa com os níveis de proteção.

Diante de um cenário com múltiplos componentes moleculares, exercendo funções reconhecidamente variadas ou ainda sem esclarecimento, torna-se importante a continuação da avaliação imunológica, com vistas ao



desenvolvimento de candidatos apropriados para estudos imunoproláticos ou com finalidade diagnóstica.

## **OBJETIVO GERAL**

Identificar, a partir de antígeno obtido de promastigotas de *L. braziliensis*, frações antigênicas e imunogênicas, avaliando a resposta imune induzida por elas, em pacientes com leishmaniose tegumentar.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Separar e obter as frações antigênicas de *Leishmania braziliensis* a partir de um extrato obtido de formas promastigotas do parasita;
- Identificar as frações obtidas por reatividade sorológica de pacientes com leishmaniose tegumentar através do immunoblotting;
- Avaliar a produção de citocinas por CMSP de pacientes com leishmaniose tegumentar em resposta às frações isoladas de promastigotas de *L. braziliensis*.

## JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar é uma doença com elevada prevalência no estado da Bahia e a *L. braziliensis* é um dos seus principais causadores. Devido à baixa frequência de culturas positivas em pacientes infectados diversos grupos têm tentado detectar componentes antigênicos de leishmania que possam ser empregados para o diagnóstico sorológico precoce das formas tegumentares, ou como marcadores de evolução para a forma mais mórbida, a leishmaniose mucosa, para assim poderem iniciar um tratamento efetivo.

Há um incessante empenho em obter moléculas de *Leishmania* capazes de, isoladamente ou em associação, induzir uma resposta imune protetora. Dessa forma, são necessários a identificação, caracterização e avaliação da composição antigênica do parasita para o desenvolvimento de estudos imunoproláticos e imunoterapêuticos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. PACIENTES E CONTROLES SADIOS**

Este estudo inclui pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA) provenientes da área endêmica de Corte de Pedra, no município de Tancredo Neves, a 210 Km ao Sul de Salvador – Bahia, Brasil. Foram incluídos 15 pacientes com leishmaniose cutânea, 5 com leishmaniose mucosa causadas por *L. braziliensis*, com diagnóstico clínico confirmado por resultados positivos da cultura em meio NNN-LIT do material obtido após biópsia e da intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva (maior que 5 mm).

Os controles sadios (n=4) foram voluntários residentes em Salvador e sem história prévia de leishmaniose.

De ambos os grupos, foi coletado sangue heparinizado para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e plasma.

### **2. MICROORGANISMO**

Promastigotas de *Leishmania braziliensis* (MOHMBR83/BA397) mantidas em nitrogênio líquido foram descongeladas e ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, New York, USA), seguido de centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm (600g), 4°C e lavagem do sedimento com solução salina 0,9% estéril, seguido de nova centrifugação nas mesmas condições supracitadas. Por último,

foi acrescentado meio de cultura de Schneider e o cultivo das células foi realizado em estufa a 25°C.

Uma vez estando na fase logarítmica de crescimento, a suspensão celular foi centrifugada a 2000 rpm (600 g) por 10 minutos a 4°C e submetida a três ciclos de lavagem com solução salina 0,9% estéril e nova centrifugação. Ao final destes ciclos, o sedimento foi estocado em freezer a -70°C, até o momento do uso.

### **3. OBTENÇÃO DO EXTRATO**

Promastigotas de *L. braziliensis* mantidas a -70°C foram ressuspensas em solução de lise que consistiu de: EDTA 0,5 M, TRIS 1 M pH 8,0 e leupeptina 10 mg/mL, como inibidor de serina e cisteína proteases. Em seguida, a suspensão celular foi submetida a ciclos de congelamento e descongelamento em N<sub>2</sub> líquido por 30 segundos e banho-maria a 37°C para o rompimento das células. O material resultante foi sonificado a 40 Hz (Sonifier 450, Branson), em ciclos de 30 segundos com 1 minuto de intervalo, até a completa destruição celular, observada por microscopia óptica. Para a separação dos restos celulares, o material foi centrifugado por 10 minutos a 4°C, 2000 rpm (600g). O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi centrifugado por 30 minutos a 4°C, 14.000 rpm (10.000g). O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi esterilizado em membranas de 0,45 e 0,22 µm. A concentração de proteínas no extrato total foi determinada pelo método micro BCA.

#### **4. FRACIONAMENTO DO EXTRATO**

Para a separação dos componentes do extrato, foi empregado o método de cromatografia por exclusão molecular em coluna de Bio – Gel P60 Fine (2,5 x 20 cm) (Bio Rad,) e eluição com água deionizada em fluxo de 5,5 ml/hora, coletando-se frações de 1,0 ml. 1,59 mg de proteína foram aplicados na coluna e a eluição foi acompanhada por leitura da densidade óptica a 280 nm em espectrofotômetro (Biotech Photometer, UV 1101– WPA) para a confecção do cromatograma. Os tubos representando o mesmo pico foram agrupados e as frações identificadas foram separadas e liofilizadas, reconstituídas em água deionizada e mantidas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A concentração de proteína nas frações foi determinada pelo método micro BCA.

#### **5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

A dosagem de proteína no extrato de *Leishmania braziliensis*, assim como nas frações obtidas a partir da separação cromatográfica foi realizada através do método micro BCA, segundo SMITH, et al., 1985 (Micro BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce Biotechnology), utilizando albumina bovina como solução padrão na faixa de 0,5 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## 6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para avaliação das frações, foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS), segundo Laemmli (1970). Foi preparado um gel em slab, com acrilamida (Bio Rad) a 10% em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, com 0,4% de SDS. A camada correspondente ao gel de empilhamento consistiu de acrilamida a 4% em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, com 0,4% de SDS. Foi utilizado o padrão de peso molecular de proteína pré-marcado, com amplitude de 14,3 a 200 KDa (GIBCOBRL). Amostras (25 µg para a reação de western blotting e 10 µg para a eletroforese) e padrão de peso molecular foram aplicados ao gel após fervura por 5 minutos em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, glicerol, SDS, azul de bromofenol e β-mercaptoetanol como desnaturante, de acordo com o protocolo Currents (GALLAGHER & SMITH, 1970).

A corrida eletroforética foi realizada utilizando MINI-PROTEAN II (Bio Rad, modelo 200/ 2.0) em tampão contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 3mM, pH 8,3, à temperatura ambiente. Foi aplicada uma corrente inicial de 10mA, seguindo-se 30 mA até o final da corrida das amostras. Ao final da corrida, o gel foi corado por nitrato de prata, de acordo com BLOOM, et al, 1987 e MORRISSEY, 1981.

## 7. WESTERN BLOTTING:

O Western blotting foi realizado de acordo com o método de TOWBIN, et al., 1979. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45  $\mu\text{m}$  (Bio Rad), utilizando para isto solução de transferência contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%, pH 8,3, durante 1 hora e 50 minutos, 40 Volts em temperatura ambiente. Após a transferência, a membrana foi submersa em solução de bloqueio, constituída de Tris 100mM, NaCl 0,9%, pH 7,5, com 0,1% de Tween 20 (TTBS) acrescido de albumina bovina 1% (BSA). Em seguida, a membrana foi incubada com solução TTBS acrescida de pool de plasma de três pacientes com leishmaniose tegumentar na diluição de 1:30 (determinada através de diluições sucessivas), lavada com TTBS, incubada com anti-imunoglobulina G (anti-IgG) humana biotinizada (diluição de 1:500 em TTBS). A membrana foi então lavada com TTBS, incubada com solução de TTBS contendo avidina conjugada com peroxidase, de acordo com o kit ABC Elite (Vector), lavada com TTBS, seguida de lavagem com solução Tris 100mM, NaCl 0,9%, pH 7,5 (TBS). Por último, a membrana foi incubada com solução de tampão fosfato (PBS) 10 mM pH 7,2 contendo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e 3,3',5,5' – tetra metilbenzidina (TMB) como cromógeno, de acordo com o kit Vector VIP (Vector) e, após a revelação das bandas imunorreagentes, a membrana foi submersa em água para interromper a reação colorimétrica.



## **8. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP):**

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas a partir sangue heparinizado, diluído 1:2 em salina a 0,9% estéril, através de um gradiente de densidade pelo Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences), em uma proporção de 3 mL de Ficoll para 10 mL de sangue. O anel de células mononucleares, rico em linfócitos, foi aspirado da interface e estas células foram lavadas 3 vezes com salina 0,9% estéril, contadas em câmara de Neubauer, ajustadas para  $3 \times 10^6$  células / mL e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (GIBCOBRL) suplementado com 10% de soro humano tipo AB, Rh positivo inativado (Sigma), L-glutamina 100 µg/ml e gentamicina 50 µg/ml

## **9. PRODUÇÃO DE CITOCINAS**

Para a avaliação da produção de citocinas,  $3 \times 10^6$  CMSP/ mL dos pacientes e controles sadios foram adicionadas a placas de cultura de 24 orifícios (Falcon), juntamente com o extrato total e as frações obtidas e cultivadas por 72 horas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20°C para posterior dosagem das citocinas  $\gamma$ -IFN, TNF- $\alpha$  e IL-10 e as células mononucleares foram empregadas para a determinação da citotoxicidade.

A concentração das frações utilizadas foi pré-determinada a partir da incubação de diferentes diluições das frações com as CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea, mucosa e controles sadios. Foram empregadas as doses de 0,01; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 50; 100 e 200 µg de proteína/ mL de suspensão celular. A concentração escolhida para cada fração foi a que induziu a produção de IFN-γ em células dos pacientes com leishmaniose e não induziu nos controles sadios.

## **10. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS FRAÇÕES:**

Após a coleta dos sobrenadantes, as células foram submetidas à avaliação do índice de viabilidade, de acordo com STROBER, 1970. As células foram ressuspensas em 500 µl de PBS e misturadas em igual volume do corante trypan blue para a contagem diferencial das células vivas e totais. O resultado desta contagem é dado pelo cálculo:

$$\text{Viabilidade} = (\text{células vivas} / \text{células totais}) \times 100$$

## **11. DOSAGEM DAS CITOCINAS**

A produção das citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-10 foi avaliada nos sobrenadantes das culturas de CMSP estimuladas pelas frações antigênicas utilizando-se o método de ELISA, empregando reagentes ou kits fornecidos comercialmente e seguindo as orientações técnicas do fornecedor. Sumariamente,

para a determinação de IL-10 e TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-citocina (IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ : PharMingen). Depois foram bloqueadas com PBS acrescido de soro fetal bovino a 10%. Em seguida, foram acrescentados os padrões e os sobrenadantes. As placas foram incubadas, novamente lavadas e anticorpo policlonal anti-citocina conjugado com biotina foi adicionado (IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ : PharMingen). As placas foram lavadas e incubadas com conjugado estreptavidina-peroxidase (Zymed), com novo período de incubação. As placas foram lavadas e a elas foi acrescentada solução de revelação, constituída de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (CALBIOCHEM). Após incubação em ausência de luz, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2N. A leitura da densidade óptica foi realizada em fotômetro leitor de ELISA (Labsystems, Multiskan®, Multisoft), com filtro de 450 nm.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

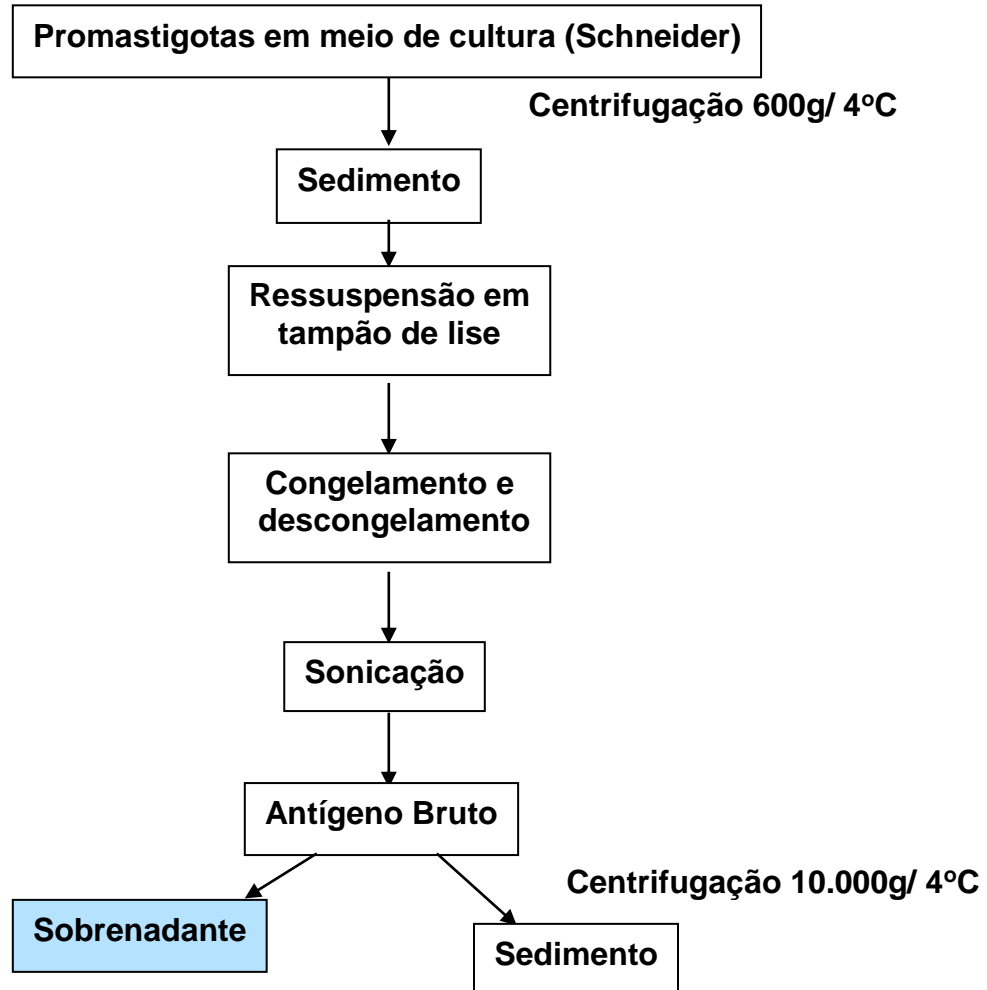
Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney e foi usado o teste não paramétrico de Spearman para a avaliação da correlação. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05.

## **COMITÊ DE ÉTICA E CONSENTIMENTO INFORMADO**

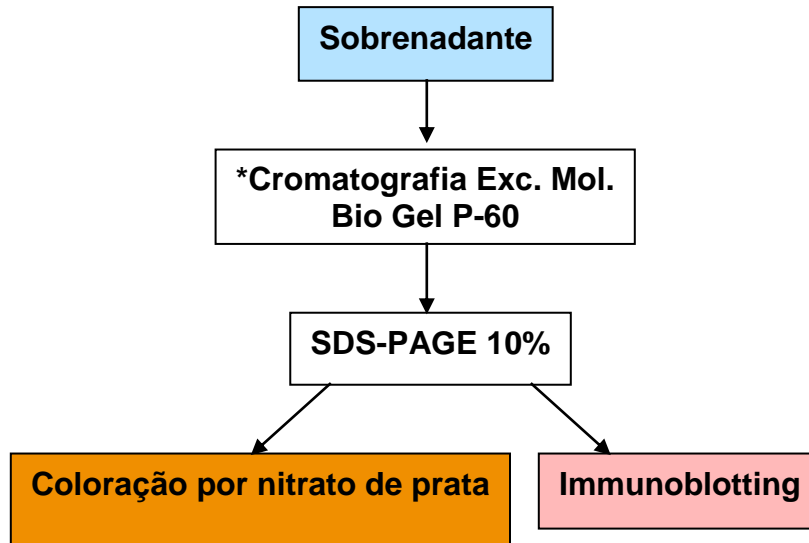
Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e os pacientes envolvidos no estudo assinaram um termo de consentimento informado.

## ESQUEMA GERAL DA METODOLOGIA

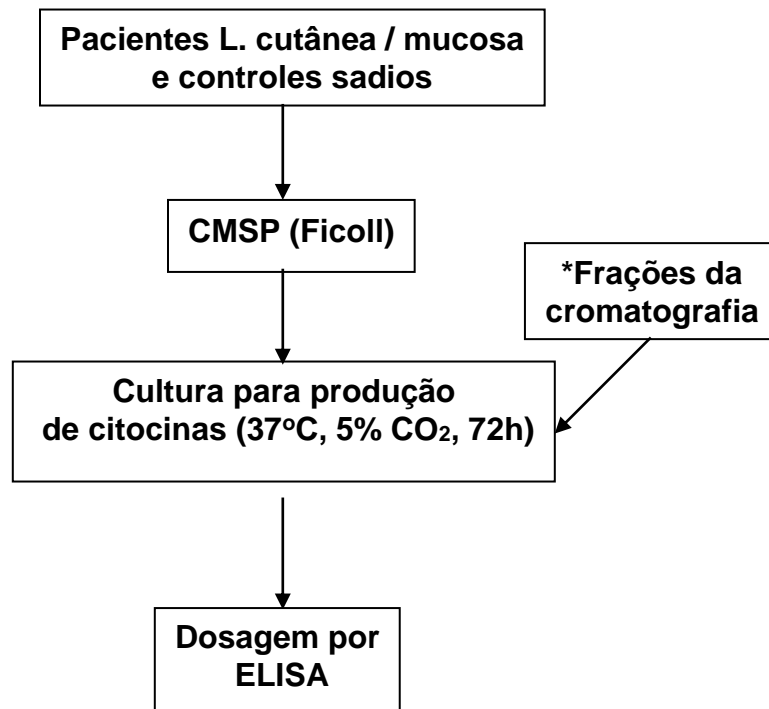
### 1. OBTENÇÃO DO EXTRATO:



## 2. FRACIONAMENTO DO EXTRATO E IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES



## 3. PRODUÇÃO DE CITOCINAS



## RESULTADOS

A tabela 1 apresenta características dos pacientes envolvidos neste trabalho. Dos 15 pacientes com leishmaniose cutânea, 33,3% foram do sexo feminino e 66,7% foram do sexo masculino, com idade média de 24,8 anos (variando de 17 a 38 anos), 47% apresentaram lesões há 30 dias, 33% relataram lesões há 60 dias e 20% informaram existência de lesões há 120 dias. Os pacientes apresentavam de 1 a 6 lesões no momento da avaliação clínica, com tamanhos variados, sendo um máximo de 42 e mínimo de 0,2 mm, sendo que esta pequena lesão era uma das quatro existentes em um paciente. O valor médio da IDRMM foi de 16,1 mm. Os 5 pacientes com a forma mucosa compreenderam 60% do sexo feminino e 40% do sexo masculino, com idade média de 18,6 anos (variando de 14 a 22 anos), o tempo de lesão variou de 60 dias a 2 anos e o valor médio da IDRMM foi 18 mm.

**Tabela 1:****Dados dos pacientes com leishmaniose cutânea**

PACIENTE	IDADE	SEXO	NÚMERO DE LESÕES	TAMANHO DA LESÃO (mm)	TEMPO DA LESÃO (dias)	IDRM (mm)
1	18	F	2	27x28 / 29x25	30	NR
2	30	M	2	18x25 / 14	21	28
3	26	M	2	40x42 / 10x10	60	20
4	20	F	1	25x20	30	20
5	17	F	6	5x8 / 17x18 / 31x14 / 20x11 / 28x25 / 5	60	10
6	21	M	1	5x5	30	12
7	19	M	4	20x25 / 6x6 / 7x6 / 0,2x0,2	120	20
8	38	M	1	20x26	30	20
9	18	M	1	12x18	60	15
10	27	M	1	NR	120	NR
11	37	F	2	8x10 / 6x14	30	10
12	24	M	1	18x18	60	15
13	31	F	1	4x5	60	14
14	27	M	1	29x28	75	12
15	19	M	6	5x9 / 4x5 / 4x4 11x6 / 5x6 / 5x5	30	14

**Dados dos pacientes com leishmaniose mucosa**

PACIENTE	IDADE	SEXO	TEMPO DA LESÃO	IDRM (mm)
1	17	F	2 anos	18
2	22	F	NR	22
3	19	M	90	15
4	14	M	60 dias	20
5	21	F	60 dias	15

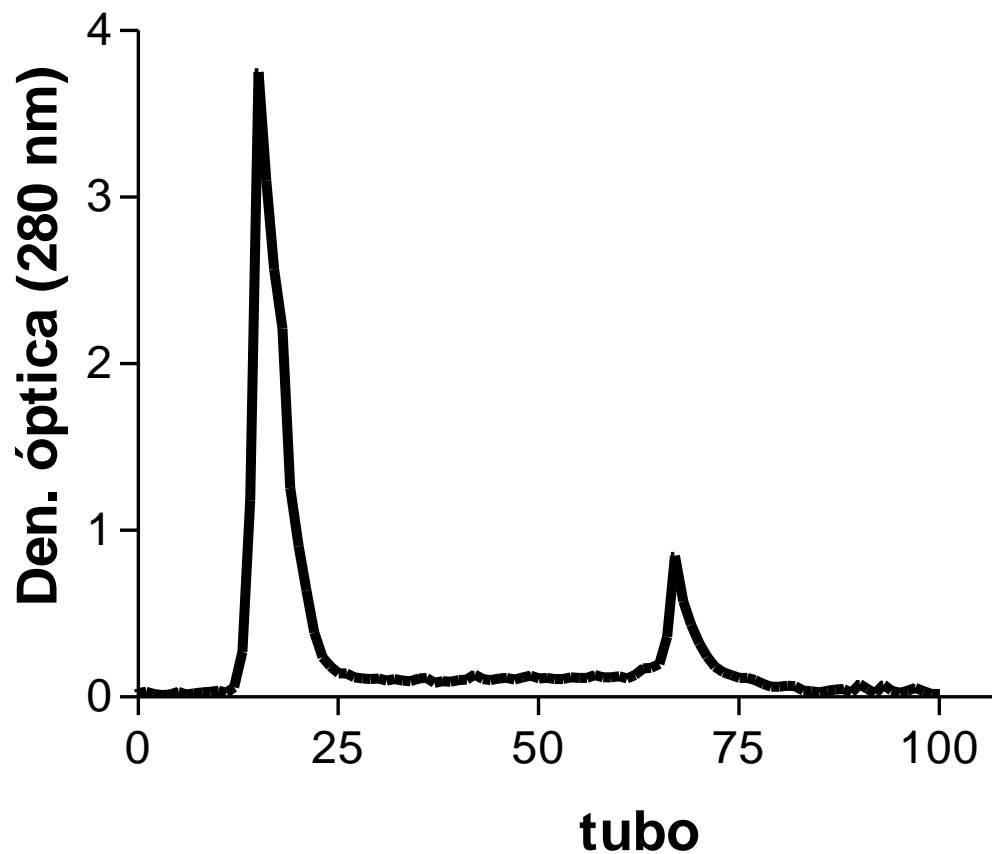
- NR: NÃO REGISTRADO



## **1. FRACIONAMENTO DO EXTRATO**

### **1.1. CROMATOGRAFIA**

Após a obtenção do cromatograma (Figura 1), foi observado um primeiro e maior pico, seguido de diversos outros muito menores e finalizando com um pico de tamanho intermediário. O maior correspondia ao volume de exclusão da coluna. Os tubos correspondentes aos demais picos foram reunidos em frações. Assim, foram obtidas 6 frações a partir de cada preparação cromatográfica, totalizando 18 frações, as quais foram submetidas a análise e comparação através da eletroforese. Após a comparação, as frações iguais foram reunidas e duas destas foram selecionadas para a continuidade do estudo, denominadas F-V e F-VI.



**Frações:**

I: tubos 14 a 18

II: tubos 19 a 23

III: tubos 24 a 40

IV: tubos 41 a 62

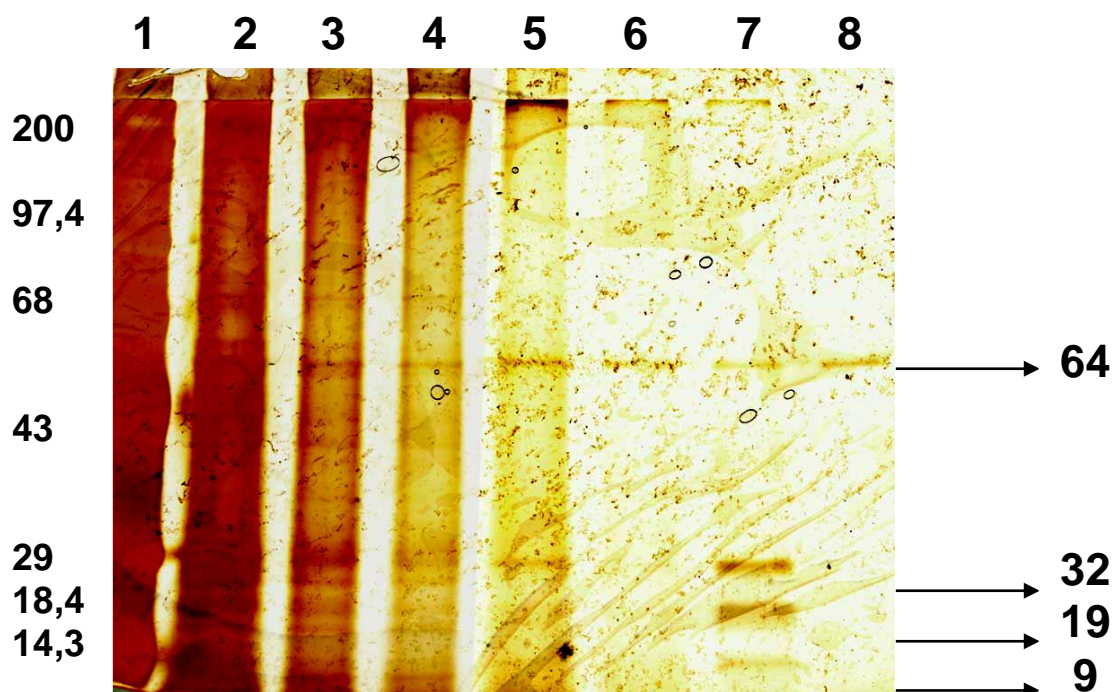
V: tubos 63 a 71

VI: tubos 72 a 100

**FIGURA 1-** Cromatografia do extrato total de *L. braziliensis* em coluna de Bio-Gel P60 eluída com água deionizada. Frações de I a VI separadas conforme indicado.

## 1.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para a realização deste procedimento, foram aplicados ao gel: padrão de peso molecular (faixa de 14,3 a 200 KDa), extrato de *Leishmania braziliensis* MHOMBR83/BA397 e frações cromatográficas obtidas. Ao final da corrida eletroforética, o gel foi corado com nitrato de prata, como descrito em Materiais e Métodos (Figura 2). É possível observar uma banda de aproximadamente 64 KDa presente de forma marcante em todas as frações, indicando que este componente, além de abundante, pode estar associado aos demais compostos presentes no extrato. Desta forma, acreditamos ter sido mais demorada e constante a sua eluição. Além desta banda, foi observado que compostos com pesos moleculares de 32, 19 e 9 KDa estavam ricamente presentes em uma das frações obtidas. Assim, a fração VI corresponde à presença da banda de 64 KDa e a fração V representa a fração contendo as bandas de 64, 32, 19 e 9 KDa.

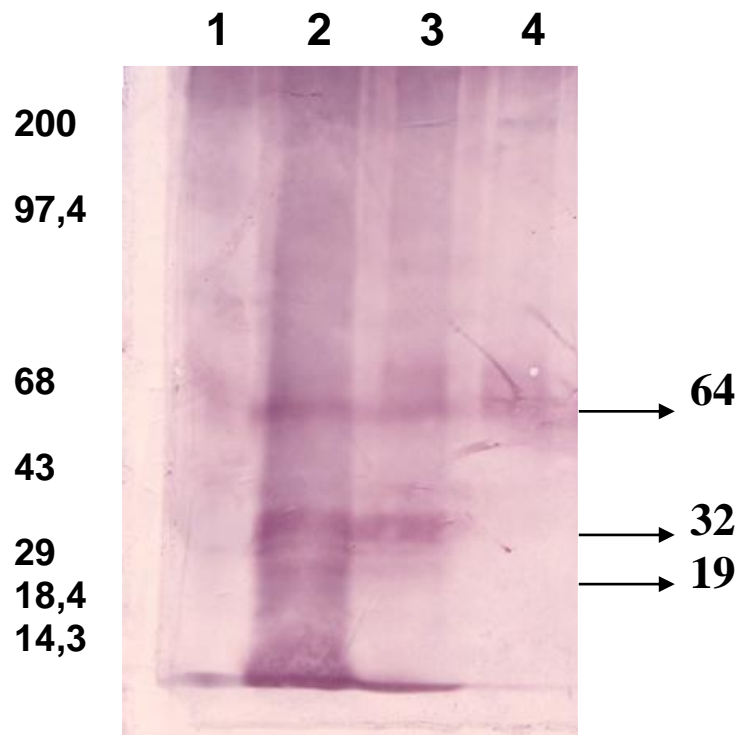


**FIGURA 2-** Eletroforese em SDS-PAGE a 10 % do extrato total de *L. braziliensis* e frações obtidas após cromatografia em Bio-Gel P 60 corado com nitrato de prata. 1: Padrão de peso molecular em KDa; 2: Extrato de promastigota de *L. braziliensis*; 3 a 8: Frações I a VI obtidas após a separação cromatográfica.

## 2. WESTERN BLOTTING

A resposta imune humoral foi avaliada através da realização de sorologia por western blotting, empregando as frações VI e V como as fontes antigênicas, assim como o extrato de *L. braziliensis*. Foi utilizado pool de plasmas de pacientes com leishmaniose cutânea.

Os resultados estão apresentados na Figura 3, mostrando que plasma de pacientes com leishmaniose cutânea reconheceram fortemente a banda de 64 KDa presente na F-VI. Plasmas desses pacientes também reconheceram as bandas de 64 e 32 KDa e mais fracamente a banda de 19 KDa, presentes na F-V. A banda de 9 KDa presente na F-V não foi reconhecida pelos plasmas desses pacientes.



**FIGURA 3-** Western blotting do extrato total e frações V e VI obtidos de *L. braziliensis* utilizando pool de plasma de pacientes com leishmaniose cutânea diluído 1:30. 1: padrão de peso molecular; 2: extrato total; 3: F-V; 4: F- VI.

### 3. PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Com a finalidade de determinar o perfil de citocinas após indução antigênica, CMSP de pacientes com as formas cutânea e mucosa de leishmaniose e de indivíduos sadios foram cultivadas com as F-V e VI, como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados das dosagens foram expressos em pg/mL. Foi realizado o teste da viabilidade celular e, mesmo na concentração antigênica de 100 µg/mL, as células permaneceram vivas (aproximadamente 90% de viabilidade). Esta foi, então a concentração de antígeno utilizada nos experimentos.

#### 4.1. IFN- $\gamma$

Os níveis de IFN- $\gamma$  foram determinados nos sobrenadantes de cultura de CMSP de 15 pacientes com leishmaniose cutânea, 5 pacientes com leishmaniose mucosa e 4 indivíduos sadios, após o estímulo com o extrato total de *L. braziliensis* e as F- V e VI obtidas após a cromatografia, como observado na tabela 2 e na figura 4.

Os indivíduos sadios não apresentaram produção relevante desta citocina para nenhuma das duas frações antigênicas. Pacientes com a forma cutânea tiveram uma produção média de 180,0 pg/mL, com desvio padrão de 233,2 quando estimulados com a F-VI e  $611,6 \pm 603,4$  pg/mL, após o estímulo com a F-V, sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0164$ ). Quando

estimulados com o extrato total, esses pacientes tiveram produção média de  $1851 \pm 200$  pg/mL.

Os pacientes com lesão mucosa apresentaram um valor médio de  $69,2 \pm 64,9$  pg/mL de IFN- $\gamma$  após indução pela F-VI e  $389,0 \pm 612,6$  pg/mL quando estimulados pela F-V, a diferença não foi estatisticamente significativa, com valor de  $p = 0,2222$ . Quando estimuladas com o extrato total, as CMSP desses pacientes tiveram produção média de  $1165 \pm 1024,5$  pg/mL.

Comparando-se a produção de IFN- $\gamma$  induzida pela F-VI nos pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa, observa-se que a forma cutânea apresentou níveis superiores, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa, com valor de  $p = 0,3949$ . Após a indução pela F-V, as células dos pacientes de leishmaniose cutânea também apresentaram níveis maiores desta citocina do que aquelas dos pacientes de mucosa, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa, tendo um valor de  $p = 0,3594$ . É importante salientar que, no caso dos pacientes com leishmaniose mucosa, o número de amostras é três vezes menor que o dos pacientes com a forma cutânea.

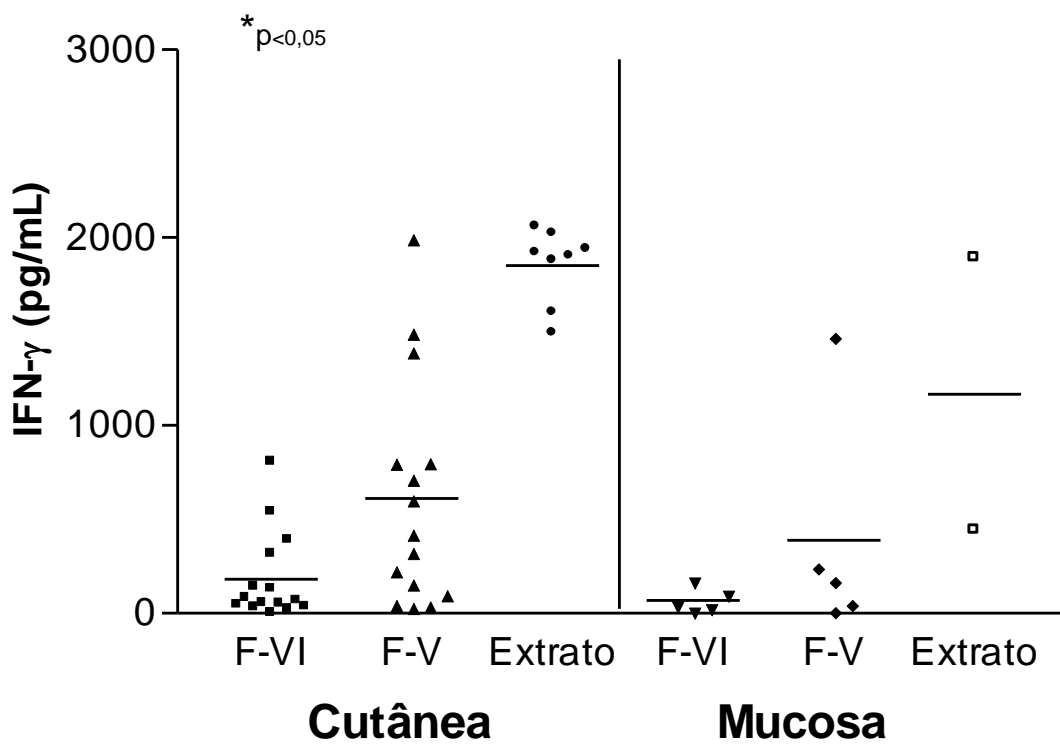


**Tabela 2:** Produção *in vitro* de IFN- $\gamma$  (pg/mL) por CMSP de indivíduos sadios e pacientes com LC e LM, após estímulo com 100 $\mu$ g/mL das Frações VI e V obtidas de *L. braziliensis*.

<b>Indivíduos sadios</b>	<b>Fração VI</b>	<b>Fração V</b>
1	2,4	2,4
2	20,1	27,4
3	8,0	11,3
4	25	21
<b>Média</b>	<b>13,9</b>	<b>15,5</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>10,5</b>	<b>10,9</b>

<b>Pacientes c/ L. cutânea</b>	<b>Fração VI</b>	<b>Fração V</b>
1	30,8	158
2	315,2	1394,5
3	65,4	804,3
4	805,9	1995,8
5	1,5	42
6	54,9	100,2
7	538,3	1494,6
8	42,8	606,2
9	127,6	716,2
10	142	327
11	81	423
12	51	229
13	389	801
14	21,6	47,7
15	33,1	34,6
<b>Média</b>	<b>180,0</b>	<b>611,6</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>233,2</b>	<b>603,4</b>

<b>Pacientes c/ L. mucosa</b>	<b>Fração VI</b>	<b>Fração V</b>
1	169	1472
2	9,7	10,4
3	98,5	244,1
4	27	47,4
5	42	171
<b>Média</b>	<b>69,2</b>	<b>389</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>64,9</b>	<b>612,6</b>



**Figura 4-** Produção *in vitro* de IFN $\gamma$  pelas CMSP de pacientes com L. cutânea e L. mucosa após a indução pelas frações VI e V (100  $\mu$ g/mL) e extrato de *L. braziliensis* (10  $\mu$ g/mL).

## 4.2. TNF- $\alpha$

Os níveis de TNF- $\alpha$  foram determinados nos sobrenadantes de cultura de CMSP de 15 pacientes com leishmaniose cutânea, 5 pacientes com leishmaniose mucosa e 4 indivíduos saudáveis, após o estímulo com as frações VI e V obtidas e o extrato total. Os dados estão apresentados na tabela 3 e na figura 5.

Os indivíduos saudáveis não apresentaram produção relevante desta citocina para nenhuma das duas frações antigênicas. Pacientes com a forma cutânea tiveram uma produção média de  $793,9 \pm 555,6$  pg/mL, quando estimulados com a F-VI e  $780,3 \pm 739,7$  pg/mL, após o estímulo com a F-V, não apresentando diferença estatisticamente significativa, com valor de  $p=0,5949$ . Quando estimulados com o extrato total, esses pacientes tiveram produção média de  $2129 \pm 521$  pg/mL.

Os pacientes com lesão mucosa apresentaram, em média, dosagem de  $583,1 \pm 637,4$  pg/mL, após indução pela F-VI e  $552,2 \pm 589,2$  pg/mL, após o estímulo pela F-V, não apresentando significância estatística ( $p>0,9999$ ). Quando estimulados com o extrato total, esses pacientes tiveram produção média de  $956 \pm 791$  pg/mL.

Comparando-se a média da produção de TNF- $\alpha$  induzida pela F-VI nos pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa, observa-se que na forma cutânea os níveis foram maiores, porém sem diferença estatisticamente significativa, com valor de  $p=0,4445$ . Após a indução pela F-V, os pacientes com leishmaniose cutânea também apresentaram níveis maiores desta citocina do que os pacientes

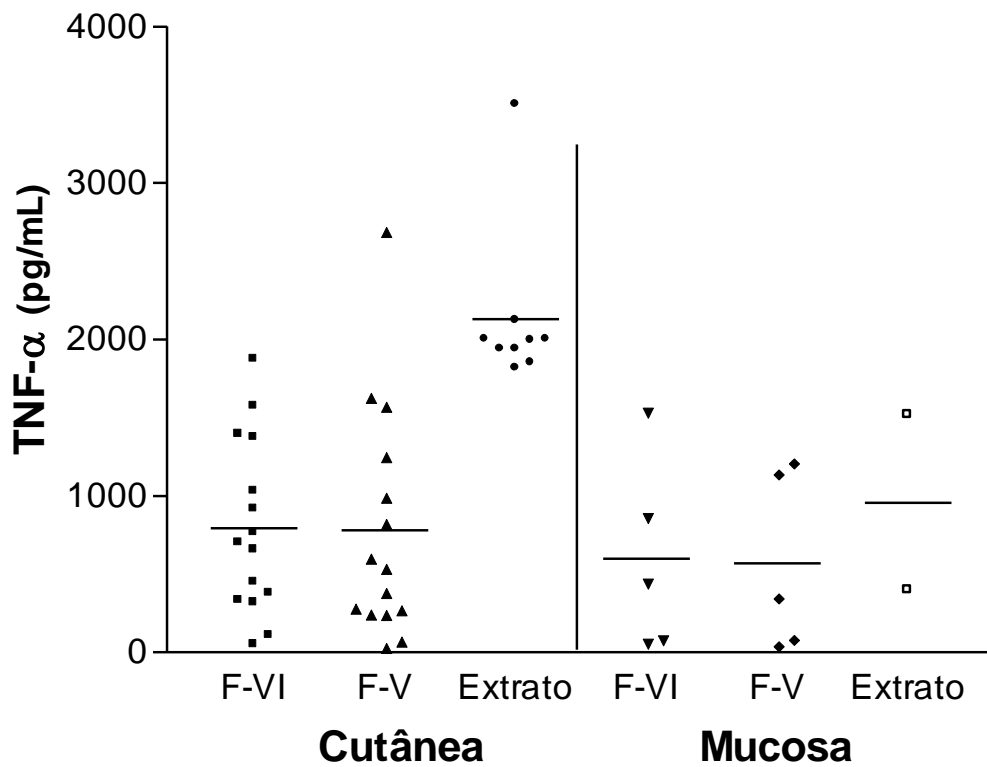
de mucosa e a diferença também não foi estatisticamente significativa, com valor de  $p= 0,4973$ .

**Tabela 3:** Produção *in vitro* de TNF- $\alpha$  (pg/mL) por CMSP de indivíduos sadios e pacientes com LC e LM, após estímulo com 100 $\mu$ g/mL das Frações VI e V obtidas de *L. braziliensis*.

<b>Indivíduos sadios</b>	<b>Fração VI</b>	<b>Fração V</b>
1	3,5	4,0
2	0,0	0,0
3	5,9	15,6
4	8,0	12,0
<b>Média</b>	<b>4,3</b>	<b>7,9</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>3,4</b>	<b>7,2</b>

<b>Pacientes c/ L. cutânea</b>	<b>Fração VI</b>	<b>Fração V</b>
1	656.8	608.2
2	447.9	1634.2
3	50.0	543.0
4	915.0	2696.0
5	377.0	247.0
6	1029.0	78.0
7	1573.0	1579.0
8	700.0	388.7
9	108.0	249.0
10	1395.0	1255.0
11	764.0	288.0
12	1372.0	997.0
13	332.0	37.0
14	1872.0	828.0
15	317.0	276.0
<b>Média</b>	<b>793,9</b>	<b>780,3</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>555,6</b>	<b>739,7</b>

<b>Pacientes c/ L. mucosa</b>	<b>Fração VI</b>	<b>Fração V</b>
1	447.00	1215
2	0	2
3	62,5	352,2
4	866	47
5	1540	1145
<b>Média</b>	<b>583,1</b>	<b>552,2</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>637,4</b>	<b>589,2</b>



**Figura 5-** Produção *in vitro* de TNF- $\alpha$  pelas CMSP de pacientes com L. cutânea e L. mucosa após a indução pelas frações VI e V (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e extrato de *L. braziliensis* (10  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.3. IL-10

Os níveis de IL-10 foram determinados nos sobrenadantes de cultura de CMSP de 15 pacientes com leishmaniose cutânea, 5 pacientes com leishmaniose mucosa e 4 indivíduos saudáveis, após o estímulo com as frações VI e V obtidas e o extrato total, como apresentados na tabela 4 e na figura 6.

Os indivíduos saudáveis não apresentaram produção relevante desta citocina para nenhuma das duas frações antigênicas. Em ambos os grupos de pacientes e utilizando as duas frações, os níveis detectados foram discretos ou não foram detectados. Pacientes com a forma cutânea tiveram uma produção média de  $54,6 \pm 63,5$  pg/mL quando estimulados com a F-VI e  $35,9 \pm 38,8$  pg/mL, após o estímulo com a F-V, não tendo diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,8679$ ). Quando estimulados com o extrato total, esses pacientes tiveram produção média de  $195 \pm 137$  pg/mL.

Os pacientes com lesão mucosa apresentaram produção média de  $22,3 \pm 24,0$  pg/mL, após indução pela F-VI e  $30,9 \pm 50,6$  pg/mL, quando estimulados pela F-V, não apresentando diferença estatisticamente significativa, com um valor de  $p = 0,7522$ . Após estímulo com o extrato total, esses pacientes tiveram produção média de  $6,9 \pm 9,8$  pg/mL.

Comparando-se a produção de IL-10 induzida pela F-VI entre os pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa, observa-se que na forma cutânea os níveis de IL-10 encontrados foram maiores, porém não apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,7932$ ). Após a indução pela F-V, os pacientes

da forma cutânea apresentaram níveis desta citocina discretamente superiores aos níveis encontrados nos sobrenadantes das células dos pacientes com L. mucosa, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,5991$ ).

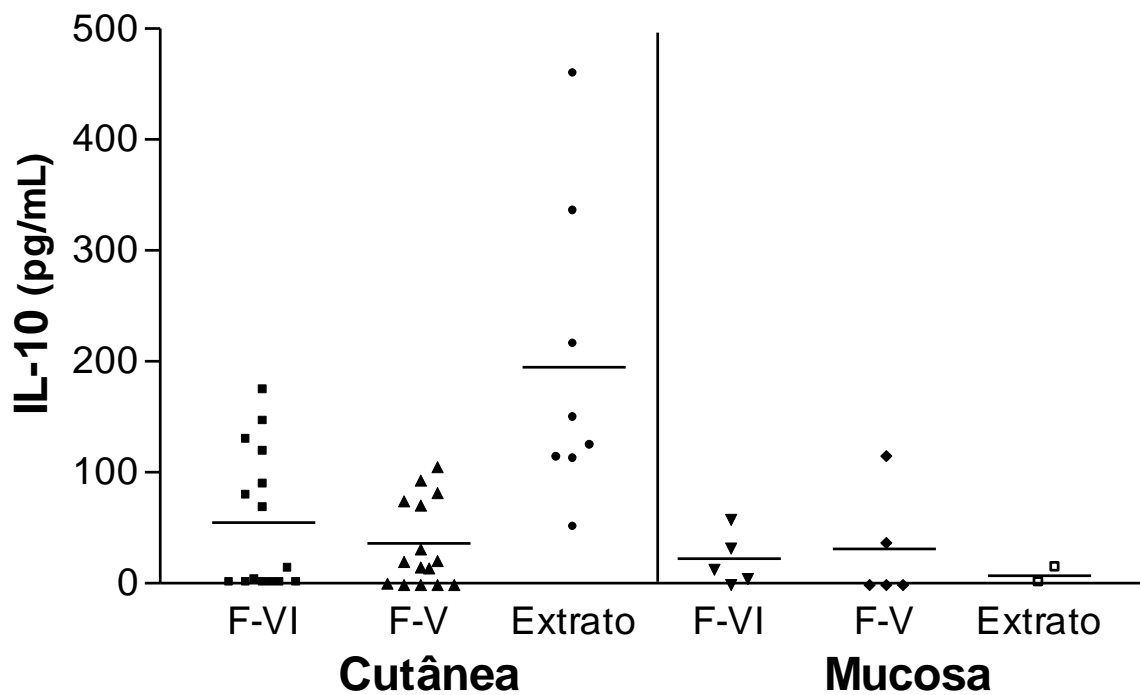


**Tabela 4:** Produção *in vitro* de IL-10 (pg/mL) por CMSP de indivíduos sadios e pacientes com LC e LM, após estímulo com 100µg/mL das Frações VI e V obtidas de *L. braziliensis*.

<b>Indivíduos sadios</b>	<b>Fração VI</b>	<b>Fração V</b>
1	0,0	0,0
2	0,0	0,5
3	0,0	1,4
4	16,0	16,0
<b>Média</b>	<b>4,0</b>	<b>4,5</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>8,0</b>	<b>7,7</b>

<b>Pacientes c/ L. cutânea</b>	<b>Fração VI</b>	<b>Fração V</b>
1	67,9	32,3
2	0	0
3	0	1,4
4	0	71,7
5	118,4	75,8
6	0	0
7	2,7	0
8	145,7	94,2
9	0	21,1
10	13	16
11	89	22
12	129,3	106,3
13	174	83
14	79,1	15,2
15	0	0
<b>Média</b>	<b>54,6</b>	<b>35,9</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>63,5</b>	<b>38,8</b>

<b>Pacientes c/ L. mucosa</b>	<b>Fração VI</b>	<b>Fração V</b>
1	5,5	0
2	0	0
3	13,9	116,6
4	33	0
5	59	38
<b>Média</b>	<b>22,3</b>	<b>30,9</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>24</b>	<b>50,6</b>



**Figura 6-** Produção *in vitro* de IL-10 pelas CMSP de pacientes com L. cutânea e L. mucosa após a indução pelas frações VI e V (100 µg/mL) e extrato de *L. braziliensis* (10 µg/mL).

## DISCUSSÃO

Diversos grupos de pesquisa vêm tentando separar e identificar componentes moleculares de leishmania a fim de avaliar a sua participação no complexo processo de patogenicidade, resistência e evasão do sistema imunológico, ou mesmo a sua importância para a imunoprofilaxia ou o imunodiagnóstico. O controle e a resolução da infecção por leishmania são mediados por mecanismos imunes celulares; assim, a identificação dos antígenos envolvidos na ativação de respostas linfocitárias permite a avaliação de efeitos indutores da exacerbação ou imunoproteção da doença. Poucos são os trabalhos disponíveis sobre separação e estudo de antígenos de *L. braziliensis*, uma espécie altamente variável geneticamente, relacionada a formas diversas e normalmente graves de leishmaniose tegumentar (SCHIEFER, et al, 2004).

Neste trabalho, foram analisados os perfis de reatividade de plasmas de pacientes com leishmaniose cutânea frente a frações isoladas de promastigotas de *L. braziliensis* e, a partir dos resultados obtidos, foram selecionadas duas frações contendo bandas reativas de 64, 32 e 19 KDa para a realização dos estudos de resposta celular.

Os antígenos de 64 e 32 KDa foram mais fortemente reconhecidos, ao contrário da banda de 19 KDa, a qual foi discretamente reconhecida pelos anticorpos presentes nos plasmas de pacientes com a forma cutânea. Uma provável explicação para estas diferenças pode ser a proporção desigual de cada um dos componentes presentes na F-V. Outra provável explicação consiste em ter sido empregado pool de plasmas de pacientes diluído em TTBS, o que pode ter

reduzido mais a probabilidade de haver efetiva reação antígeno-anticorpo. Na leishmaniose cutânea, anticorpos anti-leishmania podem ser detectados em soros, apesar de normalmente eles estarem presentes em baixos níveis.

BRITO, et al, 2000, testando soros de pacientes com leishmaniose cutânea, indivíduos sadios residentes em áreas endêmicas e pacientes portadores de outras doenças infecciosas propuseram parâmetros sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose cutânea. Assim, reação de imunoblotting deveria revelar positividade imunológica para os antígenos de 27 KDa isoladamente ou em combinação com outras bandas. Também, a presença de antígenos com 66, 48, 30, 19 e 16 KDa isoladamente ou em combinação, poderia ser utilizada como critério para o diagnóstico sorológico desta doença. Foi demonstrado por RUSSO, et al, 1991, que a gp 63 nativa ou recombinante obtida a partir de *L. amazonensis* reagia fortemente quando incubada com soro policlonal de coelho.

Trabalhos realizados por CUBA-CUBA, et al, 2001 demonstraram que antígenos de 56, 60, 66, 72, 88 e 110 KDa foram igualmente detectados por soros de pacientes com as formas cutânea e mucosa da leishmaniose, propondo que estes fossem específicos do subgênero *Viannia*. Em VALLI, et al, 1999, antígenos de 75, 66 e 45 KDa obtidos de lesão cutânea foram fortemente reconhecidos por soros de pacientes com a forma mucosa, ao contrário dos soros de pacientes com a forma cutânea. Os autores propuseram que esta modificação do perfil poderia ser empregada na predição da instalação da lesão mucosa. Em estudos de AFRIN, et al, 2002, camundongos foram imunizados com antígenos obtidos de *L. donovani* encapsulados em lipossomas e apresentaram marcante resposta de hipersensibilidade celular tardia e produção de anticorpos, principalmente

relacionada aos antígenos gp63, 72, 52, 48, 45, 39 e 20 kDa. Neste trabalho, foi sugerido que uma forte resistência à leishmaniose visceral parece depender da imunidade induzida pela gp 63 e que, devido às similaridades dos perfis de resposta induzida por estes antígenos selecionados com o antígeno total solúvel, estas moléculas sejam potenciais candidatas a estudos de vacinação contra *L. donovani*.

RYAN, et al, 2002, realizando levantamento sorológico com soros de humanos com as formas cutânea e visceral da doença e caninos com leishmaniose visceral usando antígenos de *L. donovani* e *L. mexicana*, observaram que os pacientes com a forma visceral reconheceram antígenos de *L. donovani* de alto peso molecular, juntamente com antígenos de 37 e 30 KDa. Os pacientes de cutânea reconheceram antígenos de *L. mexicana* de elevado peso molecular, sendo a menor banda correspondendo a 78 KDa. Já os soros de cães reagiram com antígenos de *L. donovani* de alto peso molecular e também com os de 41, 37 e 30 KDa. Nesse trabalho, os autores reconheceram a limitação de não terem empregado antígenos de *L. braziliensis*, considerada uma espécie mais agressiva, e propuseram existência de variações no padrão de resposta dos linfócitos B aos antígenos desta espécie, em relação ao padrão observado com os antígenos de *L. mexicana*, tida como menos agressiva.

Nos estudos realizados por BEYRODT, et al, 1997, a reação de western blotting usando um antígeno protéico com peso aproximado de 30 KDa, com reação de Schiff positiva, obtido de amastigotas de *L. amazonensis*, foi fortemente reconhecido por anticorpos monoclonais de origem murina, indicando a existência

de epitopos desta glicoproteína capazes de ativar linfócito B de camundongos BALB/c a produzir anticorpos.

SILVEIRA, et al, 2003, demonstraram através do anticorpo monoclonal SST-2 a imunolocalização de complexo antigênico de *L. braziliensis* com peso molecular entre 24 e 32 KDa, com reconhecimento mais marcante de epitopos conformacionais na faixa de 24 a 28 KDa. Foi sugerido que tal complexo fosse específico desta espécie, com localização na superfície do promastigota, incluindo o flagelo. Após a inibição do SST-2 por oxidação com periodato, foi sugerido que os antígenos reconhecidos fossem glicosilados.

BRITO, et al, 2001 demonstraram que a frequência e a intensidade da reação sorológica entre soros de pacientes de cutânea ao antígeno de 19 KDa obtido de *L. braziliensis* aumentavam após a cura, sugerindo um papel imunoprotetor deste antígeno contra a leishmaniose cutânea. Também demonstraram que a frequência de reconhecimento sorológico dos antígenos de 27 e 30 KDa, inicialmente elevada, caiu para a metade após a cura e sugeriram que estes antígenos fossem úteis como marcadores de cura para a leishmaniose cutânea.

No presente trabalho, as moléculas encontradas apresentam peso molecular muito próximo a algumas já descritas na literatura. Assim, é provável que se tratem das mesmas moléculas e as pequenas diferenças entre os pesos podem ser causadas por variações da metodologia utilizada. Dada a grande variabilidade entre os resultados encontrados em diferentes estudos, parece ser ainda prematura a sugestão de antígenos definidos de leishmania como

imunomarcadores da evolução para a forma mucosa ou ainda como ferramenta para diagnóstico sorológico.

Analisando-se os resultados das dosagens de IFN- $\gamma$ , observa-se que as CMSP dos pacientes de cutânea e mucosa foram estimuladas por ambas as frações, principalmente a F-V, e que esta última estimulou, em média, 3 vezes mais do que a F-VI, quando foram utilizadas as CMSP dos pacientes com a forma cutânea. Os resultados entre estas duas frações indicam que os antígenos de 32, 19 e 9 KDa presentes na fração V poderiam potencializar os efeitos imunoestimulatórios da molécula de 64 KDa e apontariam para a possibilidade de estas moléculas ou a combinação entre elas exercerem um papel imunoprotetor em pacientes com lesão cutânea, visto os elevados níveis observados de IFN- $\gamma$ , importantes para o desenvolvimento de imunidade contra parasitas intracelulares, como é o caso da infecção por *Leishmania*.

Apesar da fração V ter induzido uma maior produção desta citocina em relação à fração VI, após a indução de células de pacientes com a lesão mucosa, não houve diferença estatisticamente significativa. A resposta celular linfocitária, com produção de IFN- $\gamma$ , representa uma importante ação sobre o controle da evolução da doença tegumentar, dada a sua determinante participação sobre a ativação macrofágica, responsável pela destruição dos protozoários intracelulares (CRUZ, et al, 2002). No presente trabalho, os níveis de IFN- $\gamma$  encontrados nos pacientes com lesão mucosa foram menores do que em pacientes com lesão cutânea, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa. Este dado está em desacordo com os resultados encontrados por CRUZ, et al, 2002, em que

CMSP de pacientes com leishmaniose mucosa e cutânea foram estimuladas com SLA de *L. braziliensis* e foram observados níveis mais elevados desta citocina, assim como IL-4 e IL-5 no primeiro grupo de pacientes em relação ao segundo. Tal diferença pode estar relacionada ao fato de que os autores empregaram lisado total de promastigotas, com toda a sua complexa composição, e aqui neste trabalho foram empregadas frações de um lisado, as quais podem exercer papéis sinérgicos ou antagônicos, dependendo de estarem isoladamente ou associados a outros componentes da leishmania. Outro aspecto é o tamanho amostral: foram incluídos cinco pacientes com lesão mucosa, muito menos do que os quinze pacientes com lesão cutânea, o que pode ter interferido na avaliação estatística.

Em estudos de FOLLADOR, et al, 2002, a aplicação da Leishvacin<sup>®</sup> (Biobrás) associada ao GM-CSF recombinante em indivíduos sadios, sem história prévia de residência ou contato com área endêmica para leishmaniose foi avaliada por 42 dias e foi observado que os antígenos de *L. amazonensis* presentes nesta vacina induziram significativamente a produção de IFN- $\gamma$ , enquanto que estimulavam baixas concentrações de IL-10. CARDOSO, et al, 2003 separaram por eletroeluição em gel os componentes antigênicos presentes na vacina Leishvacin<sup>®</sup>, tendo obtido moléculas de 42, 46, 63, 66, 73, 87, 97 e 160 KDa. Após a indução *in vitro* de linfócitos de baço de camundongos C57BL/10 previamente vacinados com cada um desses antígenos, houve uma discreta produção de IFN- $\gamma$ , sendo seus valores comparáveis aos obtidos após a indução com a Leishvacin<sup>®</sup> total. Também, as proteínas foram capazes de proteger os animais contra o desenvolvimento de lesão, após o desafio com promastigotas de *L. amazonensis*,



sendo que as proteínas de 63, 87 e 160 KDa foram as responsáveis pelos maiores índices de proteção (53%), comparáveis aos da própria vacina, seguido das proteínas de 46, 66, 73 e 97 KDa, com índices de proteção de 42,86%. Neste trabalho, os autores ressaltaram a ação das gp 46 e 63 como potentes indutoras da imunidade protetora e da síntese dessa citocina pró-inflamatória em camundongos suscetíveis. Segundo os estudos de SILVEIRA, et al, 1998, gp 46 de *L. amazonensis* induziu fracamente a proliferação de linfócitos, assim como a produção de IFN- $\gamma$ . McMAHON-PRATT, et al, 1992, sugeriram a existência de diferenças na glicoproteína de 46 KDa entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, o que poderia vir a justificar variações entre os resultados encontrados quando são empregadas espécies distintas.

Trabalhos realizados por RUSSO, et al, 1991, demonstraram que a gp 63 nativa ou recombinante, obtida a partir de *L. amazonensis*, foi capaz de induzir a produção de elevados níveis de IFN- $\gamma$  em culturas de CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea, mucosa e visceral. NASCIMENTO, et al, 1990, observaram que os linfócitos de pessoas previamente imunizadas com promastigotas mortas foram capazes de proliferar após cultura com gp 63 de *L. amazonensis* e sugeriram um papel imunodominante para esta glicoproteína de superfície. TSAGOZIS, et al, 2004, utilizando células dendríticas pulsadas com peptídeos sintéticos ou nativos de gp 63 para imunizar camundongos BALB/c infectados com *L. major*, observaram redução na formação das lesões e da carga parasitária, além de significativa resposta imune antígeno-específica.

Os estudos realizados por BEYRODT, et al, 1997, demonstraram que um antígeno protéico de 30 KDa localizado em megassoma de amastigotas de *L. amazonensis*, obtido através de eletroeluição, foi capaz de induzir altos níveis de IFN- $\gamma$  quando incubado com células de linfonodos predominantemente linfócitos TCD4<sup>+</sup> de camundongos BALB/c, reconhecidamente suscetíveis a leishmania. A avaliação da capacidade imunoprotetora deste antígeno foi realizada através do uso de animais previamente imunizados com a p30 e desafiados com amastigotas de leishmania, observando-se uma significativa redução do tamanho das lesões na pata em relação ao grupo controle, indicando uma função imunoprotetora desta molécula em modelo animal. Desta forma, este trabalho mostrou a participação desta proteína como importante indutora de resposta do tipo Th1 , com a destruição dos parasitas pelos macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ . BACELLAR, et al, 2002, usando SLA como indutor, demonstraram que a retirada das células TCD4<sup>+</sup>, importantes para a resposta imune adaptativa, era responsável pela significativa queda da produção desta citocina em pacientes de mucosa, enquanto que a retirada de linfócitos TCD8<sup>+</sup> ou NK, célula importante para a resposta imune inata antígeno-inespecífica, não interferia na produção desta citocina.

A análise dos resultados encontrados neste trabalho para as dosagens de TNF- $\alpha$  mostra que, apesar dos altos valores médios encontrados, não houve diferença nos níveis de indução entre as duas frações e entre as duas formas clínicas estudadas, indicando que os componentes moleculares de 32, 19 e 9 KDa associados ao composto de 64 KDa não interferiram na produção desta citocina. Houve uma grande variação dos valores encontrados nos diferentes grupos de

pacientes, o que poderia ser justificado em função do tempo ou quantidade das lesões, porém avaliando a correlação através do teste de Spearman entre estas duas variáveis e as citocinas, o valor de “r” é baixo e não significativo, não sendo útil para qualquer informação. Por outro lado, correlacionando-se as dosagens de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  obtidas dos pacientes com lesão mucosa, observa-se que, quando estimuladas pela F-V, os níveis de TNF- $\alpha$  apresentaram forte correlação positiva com IFN- $\gamma$ , com  $r=0,90$  e  $p=0,037$ . Mesmos valores foram encontrados após a correlação entre TNF- $\alpha$  e IL-10 para o estímulo com a F-VI em pacientes com lesão mucosa. Estas informações nos levam a sugerir que, para este grupo de pacientes, os quatro antígenos estariam atuando sinergicamente para a exacerbação da resposta celular pró-inflamatória, com uma provável participação do agravamento da lesão tecidual. A baixa produção de IL-10 induzida pela F-VI estaria contribuindo para este efeito, visto que o mecanismo imunomodulador da resposta celular conferido por esta citocina estaria atuando de forma muito discreta.

Acredita-se que em pacientes com lesão mucosa ocorre resposta celular inflamatória acentuada com pouca imunomodulação pela IL-10 ou TGF- $\beta$ , daí as graves manifestações desfigurantes observadas (BACELLAR, et al, 2002). Pacientes com leishmaniose mucosa apresentam resposta imune celular exacerbada tanto *in vivo* quanto *in vitro*, com alta migração de linfócitos TCD4<sup>+</sup> para o local da lesão e marcante produção de citocinas associadas à resposta do tipo Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> (SILVEIRA, et al, 1998). BACELLAR, et al, 2002, observaram que

as principais fontes celulares em pacientes com lesão mucosa são as células TCD4<sup>+</sup>, seguidas das CD8<sup>+</sup> e dos monócitos CD14<sup>+</sup>.

Classicamente, a magnitude da resposta imune na leishmaniose cutânea depende do tempo de doença, da forma clínica, assim como da espécie do parasita e do vetor. TNF- $\alpha$  associada ao IFN- $\gamma$  são citocinas essenciais para a ativação macrofágica e produção de compostos oxigenados e de óxido nítrico, importantes para causar a morte da leishmania. A produção destas citocinas em níveis moderadamente elevados está associada a uma cura mais rápida da infecção cutânea. Em estudos de D'OLIVEIRA-JÚNIOR, et al, 2002, CMSP de pacientes com lesão cutânea curados antes e após 60 dias de tratamento com glucantime foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* e foi dosado TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes. Os resultados revelaram uma grande redução dos níveis desta citocina após o tratamento em ambos os grupos de pacientes. Níveis de IFN- $\gamma$  significativamente aumentados foram observados após a terapia no grupo de pacientes curados antes dos 60 dias, indicando que pacientes apresentando diminuição de TNF- $\alpha$  e aumento de IFN- $\gamma$  em consequência da terapia estão mais propensos à cura.

A avaliação dos níveis de IL-10 produzidos após estímulo com a F-VI mostra que, em pacientes com lesão cutânea, os níveis desta citocina foram discretamente superiores em relação aos encontrados para a F-V. Em pacientes com a forma mucosa, ao contrário, a fração contendo os quatro componentes moleculares foi capaz de induzir discretamente mais IL-10 do que a F-VI, porém em nenhuma dessas condições houve diferença estatisticamente significativa.

Tais valores discretos mostram que os linfócitos dos pacientes envolvidos neste trabalho responderam de forma muito suave ao estímulo dos antígenos de 64, 32, 19 e 9 KDa, o que pode ser insuficiente para imunomodular a resposta celular Th<sub>1</sub> *in vitro* relacionada aos altos níveis encontrados das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . IL-10 é principalmente produzida pelos linfócitos TCD4<sup>+</sup> (aproximadamente 5 a 10% destas são CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, ou as células T regulatórias – BELKAID, et al, 2002; O’GARRA & VIEIRA, 2004), CD8<sup>+</sup>, monócitos, macrófagos e linfócitos B. Ela é uma potente moduladora da proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e da produção de citocinas antígeno-específicas do tipo Th<sub>1</sub> por estas células, inibe a produção de NO pelos monócitos e macrófagos, além de inibir a capacidade de apresentação de antígenos pelos monócitos através da diminuição da expressão de moléculas MHC tipo II e moléculas co-estimulatórias como B7.1, B7.2 e ICAM-1. Em contraste, IL-10 apresenta efeitos imunoestimulatórios sobre linfócitos B, CD8<sup>+</sup> citotóxicos e células NK (COSTA, et al, 2002). Em JONES, et al, 2002, se considera também que IL-10 limite a ativação do macrófago por imunoglobulina via receptor para Fc $\gamma$ , inibindo a entrada dos parasitas opsonizados nesta célula.

Os pacientes com lesão mucosa apresentaram valores médios de IL-10 inferiores aos encontrados para os pacientes de leishmaniose cutânea após indução pelas duas frações, o que está de acordo com dados da literatura (BACELLAR, et al, 2002), demonstrando que as células dos pacientes de mucosa apresentam uma reduzida capacidade de produzir esta citocina imunomoduladora. Receptores para IFN- $\gamma$  e IL-10 são estruturalmente relacionados, assim altos níveis de IFN- $\gamma$  podem inibir a expressão de receptor para IL-10, podendo este ser

um dos principais mecanismos para a severidade das manifestações mucosas observadas.

Nos estudos realizados por BEYRODT, et al, 1997, linfócitos TCD4<sup>+</sup> de linfonodos de camundongos BALB/c apresentaram baixa produção da IL-10, em resposta à p30 de amastigotas de *L. amazonensis*, ao contrário da elevada produção de IFN- $\gamma$  observada, o que reforça a possibilidade do IFN- $\gamma$  estimular a função imunoprotetora contra a permanência da leishmania dentro dos macrófagos. HABIBI, et al, 2001 estudando a ação de gp 63 recombinante sobre a expressão de mRNA para citocinas, observaram que pacientes curados apresentaram altos níveis de expressão de mRNA para IFN- $\gamma$  e, ao contrário baixa expressão de mRNA para IL-10, ao passo que, em pacientes não curados não houve resposta para este antígeno. Assim, os autores sugeriram a rgp 63 como forte candidata a estudos de vacinação contra leishmaniose cutânea, com ênfase para o refinamento do estudo das vias de administração e adjuvantes empregados.

Os resultados alcançados por este trabalho permitiram relacionar moléculas obtidas de *L. braziliensis* com o perfil de resposta imune induzida em células provenientes das duas principais formas da leishmaniose tegumentar. Nos pacientes com leishmaniose cutânea, a associação das moléculas parece ter um papel imunoprotetor, dado os níveis encontrados das citocinas. Nos pacientes com a forma mucosa, por outro lado, é provável que a associação destas moléculas esteja colaborando para um aumento da lesão tecidual. Assim, este trabalho ajuda a ampliar os conhecimentos acerca da complexa composição deste protozoário,

abrindo espaço para a possibilidade de estudos da combinação ideal de moléculas de leishmania que seja capaz de desencadear respostas imunológicas protetoras.

## CONCLUSÕES

1. Através da metodologia empregada, foi possível obter 6 frações a partir do extrato de promastigotas de *L. braziliensis*, identificando principalmente bandas de 64 KDa isoladamente e associada a bandas de 32, 19 e 9 KDa;
2. As bandas de 64, 32 e 19 KDa foram reconhecidas por plasmas de pacientes com leishmaniose cutânea;
3. A fração onde a proteína de 64 KDa associada às de 32, 19 e 9 KDa foi capaz de produzir níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  do que a proteína de 64 isoladamente em pacientes com leishmaniose cutânea;
4. A fração onde 64 KDa está associada a 32, 19 e 9 KDa não contribuiu para um aumento da produção de TNF- $\alpha$  em CMSP dos pacientes estudados;
5. Não houve diferença entre as frações obtidas quanto à produção de TNF- $\alpha$  e IL-10.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFRIN, F.; RAJESH, R.; ANAM, K.; GOPINATH, M.; PAL, S.; ALI, N. Characterization of *Leishmania donovani* antigens encapsulated in liposomes that induce protective immunity in BALB/c mice. **Infection and Immunity**.**70(12)**:6697-706, 2002.
2. ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL, D.G. Leishmania species: Model of intracellular parasitism. **Journal of Cellular Science**.**112**:2993-3002, 1999.
3. ALLISON, A.C. Adjuvants and immune enhancement. **International Journal of Technological Assess Health Care**. **10(1)**:107-20, 1994.
4. ALMEIDA, M.C. Infective inoculum for *Leishmania*. **Trends in Parasitology**.**18**:154-155, 2002.
5. ALMEIDA, M.C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**.**98(7)**: 861-870, 2003.
6. ANTONELLI, L.R.V.; DUTRA, W.O.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K.J. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and Experimental Immunology**.**136**:341-348, 2004.
7. BACELLAR, O; LESSA, H; SCHRIEFER, A; MACHADO, P; JESUS, AR; DUTRA, WO; GOLLOB, KJ; CARVALHO, EM. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. **Infection and Immunity**.**70(12)**:6734-6740, 2002.
8. BECKER, I.; SALAIZA, N.; AGUIRRE, M.; DELGADO, J.; CARRILLO-CARRACSCO, N.; KOBEH, L.G.; RUIZ, A.; CERVANTES, R.; TORRES, A.P.; CABRERA, N.; GONZÁLEZ, A.; MALDONADO, C.; ISIBASI, A. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular & Biochemical Parasitology**.**130**:65-74, 2003.
9. BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C.A.; MENDEZ, S.; SHEVAC, E.M.; SACKS, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**.**420**:502-507, 2002.
10. BEYRODT, C.G.P.; PINTO, A.R.; FERYMÜLLER, E.; BARBIÉRI, C.L. Characterization of an antigen from *Leishmania amazonensis* amastigotes able to elicit protective responses in a murine model. **Infection and Immunity**.**65(6)**:2052-2059, 1997.

11. BLOOM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.S. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**.**8**:93-99, 1987.
12. BOGDAN, C. & RÖLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**.**28**:121-134, 1998.
13. BOURREAU, E.; PASCALIS, H.; PRÉVOT, G.; KARIMINIA, A.; JOLLY, N.; MILON, G.; BUFFET, P.; MICHEL, R.; MEYNARD, J.-B.; BOUTIN, J.-P.; ASCHIMOFF, D.; LAUNOIS, P. Increased production of interferon- $\gamma$  by *Leishmania* Homologue of the Mammalian Receptor for activated C Kinase-reactive CD4<sup>+</sup> T cells among human blood mononuclear cells: an early marker of exposure to *Leishmania*? **Scandinavian Journal of Immunology**.**58**:201-210, 2003.
14. BOURREAU, E.; PRÉVOT, G.; GARDON, J. LACK-specific CD4 (+) T cells that induce gamma interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. **Infection and Immunity**.**70**:3122-3129, 2002.
15. BRITO, M.E.F.; MENDONÇA M.G.; GOMES, Y.M.; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human Cutaneous Leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**.**7**(2):318-321, 2000.
16. BRITO, M.E.F.; MENDONÇA M.G.; GOMES, Y.M.; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.****95**(2):203-206, 2001.
17. CARDOSO, S.R.A.; da SILVA J.C.F.; COSTA R.T.; MAYRINK W.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; LIU, I.A.W.; FUJIWARA, R.T.; NASCIMENTO, E. Identification and purification of immunogenic proteins from nonliving promastigote polyvalent *Leishmania* vaccine (Leishvacin<sup>®</sup>). **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.**36**(2):193-199, 2003.
18. CARMELO, E.; MARTÍNEZ, E.; GONZÁLEZ, A.C.; PIÑERO, J.E.; PATARROYO, M.E.; del CASTILLO, A.; VALLADARES, B. Antigenicity of *Leishmania braziliensis* histone H1 during cutaneous leishmaniasis: localization of antigenic determinants. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**.**9**(4):808-811, 2002.
19. CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P.D.; COSTA, J.L.M.; REED, S.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in american cutaneous and mucosal leishmaniasis. **The Journal of Immunology**.**135**(6):4144-4148, 1985.

20. CARVALHO, E.M.; BARRAL, A; COSTA, JML; BITTENCOURT, A; MARSDEN, PD. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**.56:315-325, 1994.
21. CARVALHO, E.M.; FILHO, DC; BACELLAR, O; ALMEIDA, RP; LESSA, H; ROCHA, E. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**.53(3):273-277, 1995.
22. CARVALHO, L.P.; SOTO, M.; JERÔNIMO, S.; DONDEJI, B.; BACELLAR, O.; LUZ, V.; ORGE, G.O.; ALONSO, C.; JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. **Microbes and Infection**.5:7-12, 2003.
23. CHANG, K. & McGWIRE, B.S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biology and Disease**.1:1, 2002.
24. COSTA, A.V.; HUERRE, M.; DELACRE, M.; AURIAULT, C.; COSTA, J.M.C.; VERWAERDE. IL-10 leads to a higher parasite persistence in a resistant mouse model of *Leishmania major* infection. **Parasitology International**.51:367-379, 2002.
25. CRUZ, A.M.; BITTAR, R.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; NOGUEIRA, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; AZEREDO-COUTINHO, R.B.; COUTINHO, S.G. T-cell mediated Immune responses in patients with cutaneous or mucosal Leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**.9(2):251-256, 2002.
26. CUBA CUBA, C.A.; OGUNKOLADE, W.; HOWARD, M.K.; MILES, M.A. Immunological selection for *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens. **Annual of Tropical Medicine and Parasitology**.95(5):473-483, 2001.
27. CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**.72,132-141, 2002.
28. D'OLIVEIRA JÚNIOR, A.; MACHADO, P.; BACELLAR, O.; CHENG, L.H.; ALMEIDA, R.P.; CARVALHO, E.M. Evaluation of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.35(1):7-10, 2002.
29. DERMINE, J.F.; SCIANIMANICO, S.; PRIVE, C.; DESCOTEAUX, A.; DESJARDINS, M. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. **Cellular Microbiology**.2:115-126, 2000.
30. FOLLADOR, I.; ARAÚJO, C.; ORGE, G.; CHENG, L.H.; CARVALHO, L.P.; BACELLAR, O.; ALMEIDA, R.P.; CARVALHO, E.M. Immune responses to an inactivated vaccine against American cutaneous leishmaniasis together

with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Vaccine**.20:1365-1368, 2002.

31. FUNASA, MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 5º ed (revisada). 2000.
32. GALLAGHER, S.R.; SMITH, J. A. Eletrophoretic Separation of Proteins. In: **Currents Protocols in Immunology, Vol.1**. Colingan, J. E., Kruisbeek, A.M.; Margulies, D.H.; Shevach, E.M.; Strober, W. Section III, unit 8.4, 1970.
33. GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.36(1):71-80, jan-fev, 2003.
34. GUERREIRO, J.B.; CRUZ, A.A.; BARRAL, A; LESSA, H.A.; ROCHA, H; CARVALHO, E.M. Mucosal leishmaniasis: quantitative nasal cytology as a marker of disease activity and indicator of healing. **Annals of Otolaryngology & Rhinology**.109(1):89-94, 2000.
35. HABIBI, G.R.; KHAMESIPOUR, A.; McMASTER, W.R.; MAHBOUDI, F. Cytokine gene expression in healing and non-healing cases of cutaneous leishmaniasis in response to *in vitro* stimulation with recombinant gp63 using semi-quantitative RT-PCR. **Scandinavian Journal of Immunology**.54:414-420, 2001.
36. HEPBURN, N.C. Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**.25, 363-370, 2000.
37. ILGOUTZ, S.C. & McCONVILLE, M.J. Function and assembly of the Leishmania surface coat. **International Journal of Parasitology**.31:899-908, 2001.
38. JAFFE, C.L.; SHOR, R.; TRAU, H.; PASSWELL, J.H. Parasite antigens recognized by patients with cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**.80(1):77-82, 1990.
39. JENSEN, A.T.R.; CURTIS, J.; MONTGOMERY, J.; HANDMAN, E.; THEANDER, T.G. Molecular and immunological characterization of the Glucose Regulated Protein 78 of *Leishmania donovani*. **Biochimica et Biophysica Acta**.1549:73-87, 2001.
40. JENSEN, A.T.R.; ISMAIL, A.; GAAFAR, A.; HASSAN, A.M.E.; THEANDER, T.G. Humoral and cellular immune responses to glucose regulated protein 78 – a novel *Leishmania donovani* antigen. **Tropical Medicine and International Health**.7(5):471-476, 2002.
41. JONES, D.; ELLOSO, M.M.; SHOWE, L.; WILLIAMS, D., TRINCHIERI, G., SCOTT, P. Differential regulation of the interleukin-12 receptor during the

innate immune response to *Leishmania major*. **Infection and Immunity**.**66**,3818-3824, 1998.

42. JONES, D.E.; ACKERMANN, M.R.; WILLE, U.; HUNTER, C.A.; SCOTT, P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. **Infection and Immunity**.**70**(4):2151-2158, 2002.
43. JOSHI, P.B.; KELLY, B.L.; KAMHAWI, S.; SACKS, D.L.; McMASTER, W.R. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Molecular & Biochemical Parasitology**.**120**:33-40, 2002.
44. KANE, M.M. & MOSSER, D.M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current Opinion in Hematology**.**7**,26-31, 2000.
45. KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.****65**: 37-42, 1990.
46. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. **227**: 680-685,1970.
47. LAUNOIS, P.C.S.F.; HIMMERLICH, H.; PARRA-LOPEZ, C.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOUIS, J.A. Setting in motion the immune mechanisms underlying genetically determined residence and susceptibility to infection with *Leishmania major*. **Parasite Immunology**.**20**:223-230, 1998.
48. LEOPOLDO, P.T.G.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Immunopathogenesis and immunotherapy of leishmaniasis. **Research Advanced in Infectious Diseases**.**1**:13-23, 2003.
49. MAASHO, K.; SATTI, I.; NYLÉN, S.; GUZMAN, G.; KONING, F.; AKUFFO, H. A *Leishmania* homologue of receptors for activated C-Kinase (LACK) induces both interferon- $\gamma$  and interleukin-10 in Natural Killer cells of healthy blood donors. **The Journal of Infectious Diseases**.**182**:570-578, 2000.
50. McCONVILLE, M.J.; BLACKWELL, J.M. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. **Journal of Biological Chemistry**.**266**:15170-15179, 1991.
51. McCONVILLE, M.J.; TURCO, S.J.; FERGUSON, M.A.; SACKS, D.L. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **EMBO J**.**11**:3593-3600, 1992.

52. McDONALD, M.H.; MORRISON, C.J.; McMASTER, W.R. Analysis of the active site and activation mechanism of the leishmania surface metalloproteinase GP63. **Biochemical and Biophysical Acta.****1253**:199-207, 1995.
53. McMAHON-PRATT, D.; TRAUB-CSEKO, Y.; LOHMAN, K.L.; ROGERS, D.D.; BEVERLEY, S.M. Loss of the GP-46/M-2 surface membrana glycoprotein gene in the *Leishmania braziliensis* complex. **Molecular and Biochemical Parasitology.****50**:151-160, 1992.
54. MOLL, H.; RITTER, U.; FLOHÉ, S.; ERB, K.; BAUER, C.; BLANK, C. Cutaneous leishmaniasis: a model for analysis of the immunoregulation by accessory cells. **Medical Microbiology and Immunology.****184**:163-168, 1996.
55. MONTOYA, Y., et al. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. **Trans. Review Svc. Tropical Medicine and Hygiene.****91**:674-676, 1997.
56. MORRISSEY, J.H. Silver stainfor proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Annals of Biochemistry.****117**:307-310, 1981.
57. MUKHERJEE, M.; BHATTACHARYYA, A.; DUTTAGUPTA, S. Serodiagnostic and immunoprophylactic potencial of a 78 KDa protein of *Leishmania donovani* of Indian origin. **Medicine Science and Monitoring.****8**(4):BR117-122, 2002.
58. NASCIMENTO, E.; MAYRINK, W.; Da COSTA C.A.; MICHALICK, M.M.; MELO, M.N.; BARROS, G.C.; DIAS, M.; ANTUNES, C.M.F.; LIMA, M.S.; TOBOADA D.C.; LIU, T.Y. Vaccination of humans against cutaneous leishamniasis: cellular and humoral immune resonses. **Infection and Immunity.****58**:2198-2203, 1990.
59. NASCIMENTO, E.W.; MAYRINK, C.A.; da COSTA, M.S.M.; MICHALICK, M.N.; MEJO, G.C.; BARROS, M.; DIAS, C.M.F.; ANTUNES, M.S.; LIMA, D.C.; LIU, T.Y. Vaccination of humans against cutaneous leishmaniasis: cellular and humoral immune responses. **Infectious Immunology.****58**:2198, 1990.
60. O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nature Medicine.****10**(8):801-805, 2004.
61. PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases.****22**:1-13, 1996.

62. PONTE-SUCRE, A.; HEISE, D.; MOLL, H. *Leishmania major* lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. **Immunology**.**104**:462-467, 2001.
63. RAMÍREZ, J.R.; GILCHRIST, K.; ROBLEDO, S.; SEPÚLVEDA, J.C.; MOLL, H.; SOLDATI, D.; BERBERICH, C. Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. **Vaccine**.**20**:455-461, 2002.
64. REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Evolucionarily conserved proteins as prominent antigens during *Leishmania* infections. **Parasitology Today**.**16**:246-249, 2000.
65. REY-LANDINO, J.A., et al. *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. **Experimental Parasitology**.**85**:249-263, 1997.
66. ROCHA, P.N.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; de JESUS, A.R.; FILHO, D.C.; FILHO, A.C.; BARRAL, A.; COFFMAN, R.L.; CARVALHO, E.M. Down-regulation of Th1 type of response in early human american cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**.**180**:1731-1734, 1999.
67. RUSSO, D.M.; BURNS, J.M.; CARVALHO, E.M.; ARMITAGE, R.J.; GRABSTEIN, K.H.; BUTTON, L.L.; McMASTER, W.R.; REED, S.G. Human T cell responses to gp63, a surface antigen of *Leishmania*. **The Journal of Immunology**.**147**:3575-3580, 1991.
68. RYAN, J.R.; SMITHYMAN, A.M.; RAJASEKARIAH, G-H.; HOCHBERG, L.; STITELER, J.M.; MARTIN, S.K. Enzyme-linked Immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects Immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**.**40**(3):1037-1043, 2002.
69. SACKS, D. & KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Reviews of Microbiology**.**55**:453-483, 2001.
70. SACKS, D. & SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**.**3**(11):1041-1047, 2002.
71. SACKS, D.L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**. **69**:100-103, 1989.
72. SCHRIEFER, A.; SCHIEFER, A.L.F.; GÓES-NETO, A.; GUIMARÃES, L.H.; CARVALHO, L.P.; ALMEIDA, R.P.; MACHADO, P.R.; LESSA, H.A.; de JESUS, A.R.; RILEY, L.W.; CARVALHO, E.M. Multiclonal *Leishmania*

*braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. **Infection and Immunity**.72(1):508-514, 2004.

73. SILVEIRA, F.T.; BLACKWELL, J.M.; ISHIKAWA, E.A.; BRAGA, R.; SHAW, J.J.; QUINELL, R.J.; SOONG, L.; KIMA, P.; McMAHON-PRATT, D.; BLACK, G.F.; SHAW, M.A. T-cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the Lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. **Parasite Immunology**. 20:19-26, 1998.
74. SILVEIRA, T.G.V.; TAKAHASHI, H.K.; H. STRAUS. Immunolocalization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane antigens recognized by mAbs SST-2, SST-3, and SST-4. **Parasitology**.127:449-456, 2003.
75. SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem**.150:76-85, 1985.
76. SOTO-MANCIPE, J; GROGL, M; BERMAN, J.D. Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. **Clinical Infectious Diseases**.16:417-425, 1993.
77. STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. In: **Currents Protocols in Immunology, Vol.3**, Apx. 3 Colingan, J. E., Kruisbeek, A.M.; Margulies, D.H.; Shevach, E.M.; Strober, W., 1970.
78. TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J.. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of National Academy of Sciences**. 76: 4350-4354, 1979.
79. TSAGOZIS P., KARAGOUNI E., DOTSIKA E. Dendritic cells pulsed with peptides of gp63 induce differential protection against experimental cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**.17(3):343-52, 2004.
80. TURETZ, M.L.; MACHADO, P.R.; KO, A.I.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, R.P.; MOBASHERY, N.; JOHNSON, W.D.; CARVALHO, E.M.. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**.186:1829-34, 2002.
81. VALLI, L.C.; PASSOS, V.M.; DIETZE, R.; CALLAHAN, H.L.; BERMAN, J.D.; GROGL, M. Humoral immune responses among mucosal and cutaneous leishmaniasis patients caused by *Leishmania braziliensis*. **Journal of Parasitology**.85(6):1076-1083, 1999.



82. YAO, C.; DONELSON, J.E; WILSON, M.E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular & Biochemical Parasitology**.132:1-16, 2003.