



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



DIEGO MOTA LOPES

**EFEITO DO ANTÍGENO rSm29 DO *SCHISTOSOMA
MANSONI IN VITRO* SOBRE O PERFIL DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS E LINFÓCITOS DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Salvador, BA
2017

DIEGO MOTA LOPES

**EFEITO DO ANTÍGENO rSm29 DO *SCHISTOSOMA*
MANSONI IN VITRO SOBRE O PERFIL DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS E LINFÓCITOS DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Santos Cardoso

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Ilma Araujo

Salvador, BA
2017

Dedico este trabalho aos meus eternos educadores: meus pais, Vera Lúcia Mota Lopes e Afrânio Lopes Filho, a minhas irmãs Lorena, Juliana, Fernanda, Tatiana e Mariane, aos meus sobrinhos Alexandre, João Pedro, Bernardo, Davi e Ana Clara e principalmente a Professora Luciana Santos Cardoso.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre me permitir tentar.

Especialmente a minha orientadora Dr^a **Luciana Santos Cardoso**, pelo exemplo de ética, profissionalismo, respeito e pesquisadora, assim como pelo incentivo e pelos valiosos questionamentos e ensinamentos, auxiliando-me neste trabalho e na minha formação científica. Muito obrigado pelo respeito, carinho, humor, confiança e compartilhamentos. Obrigado por me ensinar ser cientista. Eternamente grato!

A meu colega, amigo e namorado **Luís Eduardo Viana Silva Ribeiro** por ter estado sempre presente, apoiando e ajudando em todas as etapas do doutorado.

A professora Dr^a **Maria Ilma Araujo** pelo incentivo, oportunidade e pelos valiosos ensinamentos, auxiliando-me neste trabalho e na minha formação científica.

Ao Dr. **Edgar Carvalho**, Dr. **Paulo Machado**, Dr. **Lucas Carvalho** e Dr^a **Olivia Bacellar** pesquisadores do Serviço de Imunologia e ao Dr. **Sérgio Costa** da UFMG, pelas valiosas críticas e contribuição ao trabalho.

Aos meus colegas **Jamille Fernandes**, **Tarciso Vilaverde**, **Lorena Andrade**, **Aline Báfica**, **Robson Souza**, **Jordana Batista**, **Thiago Marconi** e todos os colegas do SIM pelos momentos e experiências compartilhados.

Ao Sr. **Ednaldo Lago** e Dr. **Luis Henrique** (de Corte de Pedra) e Sr^a **Ada** (do Conde) e toda equipe pelo suporte no recrutamento e acompanhamento dos pacientes nas áreas endêmicas.

A Sra. **Dilceia** pelo apoio na secretaria.

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

Agradecimento especial aos indivíduos participantes da pesquisa, pacientes de Corte de Pedra e do Conde e aos voluntários do estudo.

A meus professores **Marcos Moreli**, **Sandra Gadelha** e colegas **Willian Freitas** e **Jonatas Rodrigues** por terem me iniciado na pesquisa ainda na graduação da UESC.

Aos meus amigos em especial a **Adailton Carvalho**, **Danilo Leal**, **Wandson Nascimento** e **Paula Maria** pelo apoio, incentivo e compreensão.

A minha família pelo suporte em todos os momentos.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro.

“Não há saber mais ou saber menos: há saberes diferente”.
(Paulo Freire)

“Estudar é Bonito!”
(Diego Lopes)

RESUMO

A resposta imune efetora contra a *Leishmania sp.* é do tipo Th1/inflamatória, porém é também responsável pela patogênese das lesões observadas na Leishmaniose. Tem sido demonstrado que antígenos do *Schistosoma sp* ou mesmo a infecção é capaz de modular a resposta do tipo Th1. No contexto da resposta imune, as células dendríticas são importantes fontes de citocinas pró e anti-inflamatórias e apresentação antigênica aos linfócitos T, influenciando na resposta do hospedeiro e no curso da infecção. Avaliamos, *in vitro*, a capacidade do antígeno rSm29 do *S. mansoni* em induzir o perfil regulatório nas células dendríticas e linfócitos e a susceptibilidade das células dos indivíduos com esquistossomose à infecção pela *L. braziliensis*. O fenótipo das MoDCs e linfócitos foram avaliados por citometria de fluxo. Os níveis das citocinas nas co-culturas foram avaliados por ELISA e a infectividade das MoDCs pela *L. braziliensis* foi avaliada por microscopia óptica e por marcação dos parasitos com CFSE. O antígeno rSm29 do *Schistosoma mansoni* aumentou a expressão de marcadores de ativação nas MoDCs e das moléculas associadas a regulação nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos com leishmaniose cutânea, além de modular a resposta inflamatória e aumento dos níveis de IL-10 nas co-culturas sem aumentar a carga parasitária. Mostramos também que as MoDCs dos indivíduos com esquistossomose são mais susceptíveis a infecção, devido a presença de um perfil regulatório nesses indivíduos, comparados aos indivíduos com leishmaniose. Nossos resultados sugerem que o antígeno rSm29 pode induzir uma resposta imune equilibrada desejável no controle dessa doença.

Palavras-chave: Leishmaniose., células dendríticas derivadas de monócitos., Linfócitos., Antígeno rSm29., *L. braziliensis*.

ABSTRACT

Th1-type response is the effector immune mechanism against *Leishmania sp.*, however is responsible for pathogenesis of lesions in Leishmaniasis. It has been shown that parasite antigens or infection by *Schistosoma mansoni*, is able to modulate the Th1-type inflammatory response. In this context of the immune response, dendritic cells are important sources of pro and anti-inflammatory cytokines and antigenic presentation to T lymphocytes, influencing the host's response and the course of infection.

We evaluated *in vitro* the ability of *S. mansoni* antigen rSm29 to induce the regulatory profile in dendritic cells and lymphocytes and the susceptibility of cells from individuals with schistosomiasis to *L. braziliensis* infection. The phenotype of the MoDCs and lymphocytes were evaluated by flow cytometry. Cytokine levels in the co-cultures were evaluated by ELISA and the infectivity of MoDCs by *L. braziliensis* was evaluated by light microscopy and by labeling of parasites with CFSE. The rSm29 antigen from *S. mansoni* increased the expression of activation markers in MoDCs and the expression of regulatory molecules associated with CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from individuals with cutaneous leishmaniasis, in addition to modulating the inflammatory response and increasing IL-10 levels in cultures without increasing the parasitic load. We also showed that the MoDCs of individuals with schistosomiasis are more susceptible to infection, due to the presence of a more regulated profile in these individuals compared to individuals with leishmaniasis. Our results suggest that the rSm29 antigen can induce a desirable balanced in the immune response for the control of this disease.

Key words: Leishmaniasis., Monocytes-derived dendritic cells., Lymphocytes., rSm29 Antigen, *L. braziliensis*.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura da Revisão de Literatura:

Figura 1. Resposta imune na leishmaniose cutânea e mucosa.....18.

Figuras do capítulo 1 – Efeito do antígeno rSm29 do *Schistosoma mansoni* *in vitro* sobre o perfil de células dendríticas e linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea

Figura 1. Isolamento de Monócitos (A) e linfócitos (C) por beads magnéticas e marcação da *Leishmania braziliensis* com CFSE (B).....40.

Figura 2. A figura representa a estratégia de seleção a partir de uma plot de densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) celular, identificando as populações de células dendríticas (superior) e linfócitos (inferior) que foram co-cultivados por 24h. A figura B representa o marcador de MoDCs (CD11c⁺) avaliado dentro da população de MoDCs e as figuras C e D as subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ ou T CD3⁺CD8⁺ avaliados dentro da população de linfócitos, respectivamente.....42.

Figura 3. Expressão das moléculas associadas a apresentação antigênica (HLA-DR e CD1a), maturação (CD83) e co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) nas MoDCs estimuladas pelo rSm29 (10µg/mL) ou LPS (100ng/mL) e infectadas ou não pela *L. braziliensis*, co-cultivadas com linfócitos autólogos por 24h. (A) CD11c⁺CD83 (%), (B) CD11c⁺HLA-DR⁺ (MIF), (C) CD11c⁺CD1a⁺ (%), (D) CD11c⁺CD80 (%), (E) CD11c⁺CD86 (%) e (F) CD11c⁺CD40 (%). Os resultados são expressos como mediana, valores min. - max. e percentis. *p<0,05 e **p<0,005. Teste de Friedman.....47.

Figura 4. Frequência de MoDCs expressando as citocinas intracelulares CD11c⁺IL-10 (A), CD11c⁺TNF (B) e CD11c⁺IL-12 (C) após 24h de co-culturas com linfócitos autólogos infectados ou não pela *L. braziliensis*, estimuladas pelo rSm29 (10µg/mL) ou LPS (100ng/mL). Os resultados são expressos como mediana, valores min. - max. e percentis. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,001. Teste de Friedman.....49.

Figura 5. Frequência de MoDCs estimuladas pelo rSm29 (10µg/mL) ou LPS (100ng/mL) e infectadas ou não pela *L. braziliensis*, co-cultivadas com linfócitos autólogos por 24h expressando o receptor de IL10 (IL-10R). (A) Plot representativo de um experimento. (B) Frequência de CD11c⁺IL-10R⁺ em MoDCs. Os resultados são expressos como mediana, valores min. - max. e percentis. *p<0,05. Teste de Friedman.....51.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 6. Frequência de linfócitos TCD4⁺ (A), T CD4⁺CD28 (B), T CD4⁺CTLA-4 (C), T CD4⁺CD25^{high} (D) T CD4⁺CD40L (E) e T CD4⁺CD25^{low} (F) nas co-culturas com MoDCs por 24h de indivíduos com LC após estímulo pelo rSm29. Os resultados foram expressos como mediana, valores min. - max. e percentis. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,001, teste T não pareado.....53.

Figura 7. Frequência de linfócitos T CD8⁺ (A) após 24h de co-culturas com MoDCs infectadas ou não pela *L. braziliensis* estimuladas pelo rSm29 de indivíduos com LC. Expressão de T CD8⁺CD28 (B), T CD8⁺CTLA-4 (C), T CD8⁺CD25 (D) e T CD8⁺CD40L (E). Os resultados foram expressos como mediana, valores min. - max. e percentis. *p<0,05, **p<0,005 e ***p <0,001, teste T não pareado.....55.

Figura 8. Níveis de IL-10 (A), TNF (B), IL-12p40 (C) e INF- γ (D) no sobrenadante das culturas de MoDCs estimuladas ou não pelo rSm29, infectadas e não infectadas pela *L. braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos por 24h. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,001. Teste de Friedman.....57.

Figura 9. Infectividade por 2h das *L. brazileiensis* nas MoDCs estimuladas pelo rSm29 (10 μ g/mL) e em seguida co-cultivadas com linfócitos autólogos por 24h. (A) Frequência de MoDCs infectadas e número de amastigotas/100 MoDCs, (B) Frequência de expressão de CFSE nas *L. braziliensis* e média de intensidade de fluorescência de CSFE ligado nas *L. brazileiensis* nas MoDCs (CD11c⁺), (C) Frequência de divisão das formas amastigotas nas MoDCs e index de proliferação das formas amastigotas nas MoDCs, (D) Grafico representativo de um experimento avaliando a infectividade das MoDCs pela *L. brazisiensis*, (E) Dot representativo de um experimento avaliando a taxa de infecção pela *L. brazisiensis* (CFSE⁺) nas MoDCs (CD11c⁺), (F) Histograma representativo de um experimento avalindo proliferação das amastigotas através da expressão de CFSE em MoDCs (CD11c⁺) . Os resultados são expressos como mediana, valores min. - max. e percentis.....59.

Tabela 1. Bloqueio de IL-10 (10ng/mL) nas culturas de células dendríticas derivadas de monócitos estimuladas com rSm29 (10 μ g/mL), infectadas pela *Leishmania braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos de pacientes com leishmaniose cutânea (n=4) por 24h. Teste T não pareado.....50.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figuras do capítulo 2 – Susceptibilidade de células dendríticas de indivíduos com esquistossomose à infecção pela *Leishmania braziliensis*

Figure 1. Frequência de moléculas de ativação, co-estimulatória, maturação e de regulação nas MoDCs de pacientes com esquistossomose e pacientes com leishmaniose infectadas pela *L. braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos. (A) CD11c⁺HLA-DR⁺ (MIF), (B) CD11c⁺CD80⁺ (%), (C) CD11c⁺CD86⁺ (%), (D) CD11c⁺CD40⁺ (%), (E) CD11c⁺CD83⁺ (%) e (F) CD11c⁺IL-10R⁺ (%). *p<0,05; **p<0,005. Teste Kruskal Wallis.....87.

Figure 2. Frequência de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (A) expressando as moléculas co-estimulatórias CD4⁺CD28⁺ (B), CD4⁺CD40L⁺ (C), CD4⁺CD25^{low} (D), CD4⁺CD25^{high} (E) e CD4⁺CTLA-4⁺ (F) após 24h de co-cultivo com MoDCs infectadas por 2h pela *L. braziliensis*. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,001. Teste Kruskal Wallis.....89.

Figure 3. Frequência de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ (A) expressando as moléculas co-estimulatórias CD8⁺CD28⁺ (B), CD8⁺CD40L⁺ (C), CD8⁺CD25⁺ (D) e CD8⁺CTLA-4⁺ (E) após 24h de co-cultivo com MoDCs infectadas por 2h pela *L. braziliensis*. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,001. Teste Kruskal Wallis.....91.

Figure 4. Produção de citocinas das culturas de dendríticas infectadas por 2h pela *L. braziliensis* após 24h de co-cultivadas com linfócitos autólogos de pacientes com esquistossomose, leishmaniose e controle. (A) IL-10, (B) IL-12p40, (C) TNF e (D) INF- γ . *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,001. Teste Kruskal Wallis.....93.

Figure 5. Cinética da frequência de MoDCs infectadas por 2h pela *L. braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos por 24h (A). Número de amastigotas intracelular em 100 células avaliadas (B) por microscopia óptica (100X). ***p<0,001. Teste Kruskal Wallis.....94.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABF	antígenos solúveis de <i>Ascaris lumbricóides</i>
APC	do inglês “Allophycocyanin”
BMDC	do inglês “Dendritic cells derived from the bone marrow”
BSA	do inglês “Bovine serum albumin”
C3b	fração da molécula 3 do complemento
CD	do inglês “clusters of differentiation”
CD40L	Ligante de CD40
CF	Citometria de Fluxo
CFSE	do inglês “Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester”
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CR	do inglês “Complement receptor”
CS	Controle Saudável
CTLA-4	do inglês “Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4”
CY	do inglês “Cycrhome”
DCs	do inglês “dendritic cells”
DC-SIGN	do inglês “DC- specific ICAM-3 grabbing non integrin”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	do inglês “Deoxyribonucleic acid”
DTH	Reação de Hipersensibilidade Tardia
FACS	do inglês “Flow cytometer cell sorter”
FcR	Receptor Fc
FITC	do inglês “Fluorescein isothiocyanate”
FSC	do inglês “Forward Scatter”
GM-CSF	do inglês “Granulocyte and Monocyte Colony Stimulating Factor”
HE	Hematoxilina Eosina
HLA	do inglês “Human leukocyte antigen”
HPV	do inglês “Human papilloma virus”
HTLV	do inglês “Human T-lymphotropic virus”
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	Interferon-gama

iNOS	do inglês “Inducible nitric oxide synthetase”
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-10R	receptor da interleucina 10
IP	Índice de Proliferação
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LD	Leishmaniose Disseminada
Li	Linfócitos
LIT	do inglês “Liver Infusion Triptose” meio de cultura
LM	Leishmaniose Mucosa
LPG	Lipofosfoglicanos
LPS	Lipopolissacarideo
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MoDCs	do inglês “Dendritic cells derived from monocytes”
MHC	do inglês “Major Histocompatibility Complex”
MIF	Média de intensidade de fluorescência
NLR	do inglês “Nod Like Receptor”
NNN	meio de cultura celular do inglês “Neal, Novy, Nicolle”
NO	Óxido nítrico
NK	do inglês “Natural Killer”
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	do inglês “Peripheral Blood Mononuclear Cells”
PBS	do inglês “Phosphate-buffered saline”
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction”
pDCs	Células Dendríticas Plasmocitóides
PE	do inglês “Phytoerythrin”
PMB	Polimixina B
PMN	Polimorfonucleares
pg	picograma
PPFP	Porcentagem de parasito fluorescentes positivos
RPMI	meio de cultura celular do inglês “Roswell Park Memorial Institute”
Sb ^v	Antimonial pentavalente
SEA	do inglês “Soluble egg antigen” de <i>Schistosoma mansoni</i>

SLA	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SIM	Serviço de Imunologia
SM	indivíduos infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>
Smteg	Antígeno do tegumento esquistossômulo do <i>Schistosoma mansoni</i>
rSm29	Antígeno recombinante do <i>Schistosoma mansoni</i>
SC	do inglês “Subclinical”
Sj16	Antígeno recombinante do tegumento do <i>Schistosoma japonicum</i>
SSA	do inglês “Soluble antigen of the schistosomaker” do <i>S.mansoni</i>
SSC	do inglês “Side Scatter”
SWA	do inglês “Soluble worm antigen” de <i>Schistosoma mansoni</i>
RNAm	do inglês “Ribonucleic Acid Messenger”
TcES	antígeno secretório de <i>Taenia crassiceps</i>
TGF	do inglês “Tumor growth factor”
Th	do inglês “T helper”
TLR	do inglês “Toll-like receptor”
TNF	do inglês “Tumor Necrosis Factor”
Treg	Linfócitos T regulatórios
WHO	do inglês “World Health Organization”
WT	do inglês “Western Blot”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
	2.1 RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO PELA <i>LEISHMANIA SP</i>	17
	2.2 IMUNOPATOGENESE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA	20
	2.3 PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA PATOGENESE DA LC	21
	2.4 PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS T NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA	22
	2.5 INTERAÇÃO ENTRE AS CÉLULAS DENDRÍTICAS E LINFÓCITOS T	23
	2.6 IMUNOTERAPIA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA	24
	2.7 ANTÍGENOS DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> COMO MODULADORES DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA NAS DOENÇAS DO TIPO Th1 E Th2.....	28
3	HIPÓTESE	31
4	OBJETIVOS	31
	4.1 OBJETIVO GERAL.....	31
	4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5	CAPÍTULO 1: Manuscrito 1: Efeito do antígeno rSm29 do <i>Schistosoma mansoni in vitro</i> sobre o perfil de células dendríticas e linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea	32
	5.1 INTRODUÇÃO.....	33
	5.2 METODOLOGIA.....	37
	5.3 RESULTADOS	45
	5.4 DISCUSSÃO	60
	5.5 CONCLUSÃO.....	70
	CONFLITOS DE INTERESSES	70
	AGRADECIMENTOS	70
	REFERÊNCIAS BIBLIORGRÁFICAS	71
6	CAPÍTULO 2: Manuscrito 2: Susceptibilidade de células dendríticas de indivíduos com esquistossomose à infecção pela <i>Leishmania braziliensis</i>	78
	6.1 INTRODUÇÃO.....	79
	6.2 METODOLOGIA.....	82
	6.3 RESULTADOS	86
	6.4 DISCUSSÃO	95
	6.5 CONCLUSÃO.....	100

CONFLITOS DE INTERESSES	100
AGRADECIMENTOS	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
7 CAPÍTULO 3: Manuscrito 3: Revisão: Aspectos imunopatogênicos e diagnósticos na leishmaniose tegumentar americana.....	107
7.1 INTRODUÇÃO.....	109
7.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	114
7.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	115
7.4 TRATAMENTO.....	122
CONFLITOS DE INTERESSES	127
AGRADECIMENTOS	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
8 CONCLUSÃO GERAL	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
APÊNDICE	155
OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO	155
CAPÍTULO DE LIVRO ESCRITO DURANTE O DOUTORADO.....	155
ANEXOS.....	156
ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCL	156
ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCL para menores.....	159
ANEXO III – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	160

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leishmaniose é uma doença endêmica na América do Sul e Central, África e Ásia, causada por uma variedade de espécies de *Leishmania* transmitidas pela picada de flebotomíneos infectados (WHO, 2017). Atualmente, mais de 88 países de clima tropical e sub-tropical são afetados pela leishmaniose, sendo somente em 32 desses países a doença considerada de notificação compulsória, tendo assim um número substancial de casos não reportados (GONTIJO *et al.*, 2003; WHO, 2017). O Brasil figura entre os cinco países mais afetados, apresentando altas incidências dessa enfermidade (WHO, 2017). Na Bahia existe uma elevada incidência de leishmaniose (22/100.000 hab), sendo distribuída principalmente em áreas de atividades agrícolas e regiões com desmatamentos (BRASIL, 2017). A doença afeta indivíduos jovens e mesmo crianças que se expõem à infecção com frequência na atividade agrícola, atingindo indivíduos em idade produtiva (COSTA *et al.*, 1998).

A *Leishmania* é um parasito intracelular que causa um amplo espectro de doenças no homem, variando desde lesões cutâneas localizadas, na leishmaniose tegumentar americana (LTA) até as formas viscerais. A LTA apresenta-se clinicamente sobre quatro formas distintas da doença: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose disseminada (LD), causadas principalmente pela *L. braziliensis* e leishmaniose cutânea difusa (LCD) causada principalmente pela *L. amazonensis* (MARSDEN *et al.*, 1990c; a; b; YURDAKUL *et al.*, 2005). Cerca de 10-15% dos indivíduos residentes em áreas endêmicas apresentam teste de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania* ou produção de INF- γ positivos a estes antígenos, entretanto não desenvolvem a doença, caracterizando uma forma subclínica (FOLLADOR *et al.*, 2002; BITTAR *et al.*, 2007; SCHNORR *et al.*, 2012).

A leishmaniose cutânea representa cerca de 90 a 95% dos casos de LTA (BRASIL, 2017). Caracteriza-se, clinicamente, por uma úlcera cutânea bem delimitada com bordas elevadas, com um fundo geralmente granuloso (JONES *et al.*, 1987). A lesão cutânea se instala no sítio de entrada do parasito após período de incubação estimado de uma a duas semanas (GONZALEZ *et al.*, 2009). Aproximadamente 3% dos pacientes com LC desenvolvem a doença mucosa que afeta principalmente a região naso-faríngea, concomitantemente ou meses após o aparecimento da úlcera cutânea (JONES *et al.*, 1987).

As principais drogas preconizadas pela OMS para o tratamento são o antimonial pentavalente (Sb^v) e a anfotericina B. Porém, os efeitos colaterais, a toxicidade e a falência terapêutica observadas apontam para a necessidade de novas estratégias para o tratamento dessa doença (SAENZ *et al.*, 1991; MARSDEN *et al.*, 1994). As observações de que a imunoterapia adjuvante, além de diminuir o tempo de cicatrização das lesões, é efetiva para o tratamento de formas resistentes tornam essa perspectiva terapêutica a mais promissora atualmente (AREVALO *et al.*, 2001; MANN *et al.*, 2006).

Neste contexto de imunomodulação, alguns estudos vêm demonstrando que a infecção por helmintos, particularmente pelo *Schistosoma sp.* ou produtos do parasito, é capaz de modular a resposta inflamatória do tipo Th1 envolvida tanto em algumas doenças auto-imunes, a exemplo do diabetes tipo I, artrite e psoríase (COOKE *et al.*, 1999; SEWELL *et al.*, 2002; LA FLAMME *et al.*, 2003; ATOCHINA E HARN, 2006) como em doenças infecciosas, a exemplo da infecção pelo HTLV-1 (LIMA *et al.*, 2013, LIMA *et al.*, 2017) e da leishmaniose cutânea (BAFICA *et al.*, 2011, BAFICA *et al.*, 2012, LOPES *et al.*, 2014).

Estudos realizados pelo nosso grupo da Imunologia do SIM, UFBA, mostraram que antígenos do *S. mansoni*, a exemplo do rSm29, foram capazes de induzir, tanto *in vitro*, como em modelo experimental a expressão de células e moléculas regulatórias, a exemplo da IL-10, capazes de regular a resposta imune em doenças que cursam com resposta exacerbada do tipo Th1 ou Th2 (CARDOSO *et al.* 2010; BAFICA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2013; DE ALMEIDA *et al.*, 2017). Diante dessas observações o presente estudo utilizou a proteína recombinante do *S. mansoni*, rSm29 na tentativa de modular a resposta inflamatória das células dendríticas e de linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea. Os estudos dessa natureza poderão fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de doenças que cursam com a ativação exacerbada e por isso inapropriada da resposta imune, a exemplo da LTA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO PELA *LEISHMANIA SP.*

A transmissão da *Leishmania* se dá pela picada da fêmea de flebotomíneo infectada, que inocula na pele do hospedeiro formas promastigotas metacíclicas infectantes, suspensas na saliva do flebotomíneo (TITUS E RIBEIRO, 1988). É bem documentado que as diferentes manifestações clínicas da doença estão relacionadas a fatores intrínsecos do parasito, a exemplo da espécie e virulência da *Leishmania*, mas também fatores relacionados a resposta imune do hospedeiro.

A inoculação das formas promastigotas metacíclicas induz o recrutamento de células de defesa do hospedeiro, tais como células dendríticas, macrófagos/monócitos, células NK e leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN), bem como a liberação de fatores solúveis como a proteína C reativa (PCR) e fatores do sistema complemento (SOLBACH E LASKAY, 2000; reviewed DE ALMEIDA *et al.*, 2003). As promastigotas metacíclicas liberam um fator quimiotático para PMN (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2002), os quais são as primeiras células a chegarem ao sítio da infecção (SUNDERKOTTER *et al.*, 1993; LAUFS *et al.*, 2002).

Os neutrófilos são estimulados pela *Leishmania* a produzirem quimiocinas que atuarão no recrutamento de granulócitos, monócitos/macrófagos, células dendríticas imaturas e linfócitos T (MULLER, *et al.*, 2001).

Após serem inoculados na pele e durante o processo de migração através da matriz extracelular (DE SMEDT, *et al.*, 1997), as formas promastigotas metacíclicas podem ser fagocitadas por macrófagos residentes na pele, células dendríticas teciduais (Langerhans) e por monócitos circulantes (SALAIZA-SUAZO *et al.*, 1999). As células de Langerhans, funcionam, inicialmente, com um “habitat seguro” para a *Leishmania* em função da deficiência de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS, NOS-2), que não permite que essas células produzam Óxido Nítrico (NO) para eliminação do parasito (BOGDAN *et al.*, 1996; CUNNINGHAM, 2002; MOLL *et al.*, 2002). Dentro de poucos dias de infecção, as células dendríticas da pele transportam o parasito do sítio da infecção na pele aos linfonodos regionais de drenagem. Durante esta migração, se diferenciam em células dendríticas maduras com potentes funções apresentadoras de antígeno e capacidade de ativar células T. Como a infecção parasitária, de um

modo geral estimula as células dendríticas a produzirem interleucina 12 (IL-12) na fase inicial da infecção (Figura 1), estas células se tornam fundamentais para o desenvolvimento precoce de uma resposta Th1 protetora (MOLL *et al.*, 2002). Além disso, as células apresentadoras de antígenos infectadas produzem IL-12 que atuam sobre as células NK, induzindo-as a produzirem IFN- γ , citocina responsável pela ativação de mecanismos microbicidas de macrófagos (MURRAY *et al.*, 1985; TRINCHIERI *et al.*, 1995).

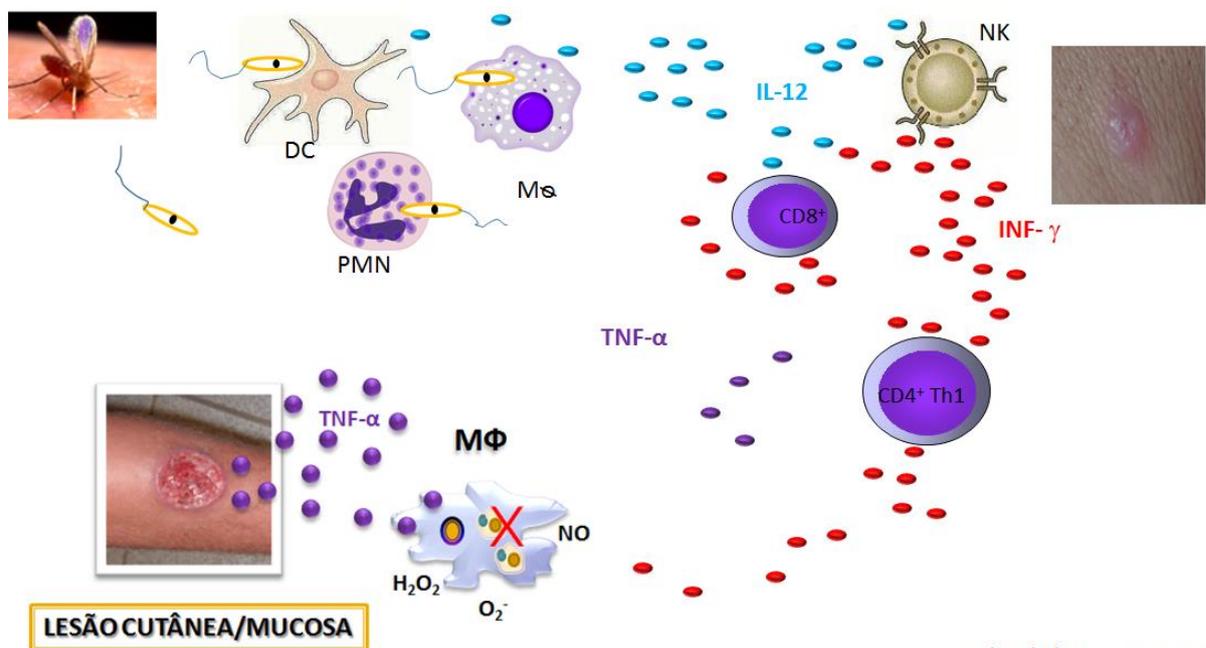


Figura 1. Resposta imune na leishmaniose cutânea e mucosa.

Em modelos experimentais de leishmaniose utilizando-se camundongos susceptíveis, a infecção por *L. major* promove um aumento da expressão de receptores para IL-4 nas células de Langerhans infectadas e, em consequência um pico de IL-4 no linfonodo de drenagem nos primeiros dias da infecção e diminuição da produção de IL-12. Em camundongos resistentes a infecção por *Leishmania* a IL-4 não alterou a produção de IL-12, provavelmente por não apresentarem um aumento da expressão de receptores para IL-4 após a infecção pelo parasito, como ocorre nos camundongos susceptíveis (MOLL *et al.*, 2002).

Embora as formas promastigotas possam infectar as células de Langerhans e os PMN, os macrófagos são as principais células hospedeiras para a *Leishmania*. A *Leishmania* penetra nos fagócitos mononucleares, principalmente nos macrófagos, através de endocitose mediada por receptores, dentre os quais os mais importantes

são os receptores do complemento CR1 e CR3. A opsonização com C_{3b} e C_{3bi} ocorre pela ligação aos receptores CR1 e CR3, respectivamente, e sua importância consiste na mediação da fagocitose sem ativação da cascata oxidativa, que é danosa ao parasito. Outro benefício para o parasito com o uso do receptor CR3 é que essa interação inibe a imunidade celular induzida por IL-12. As moléculas de lipofosfoglicano (LPG) e a gp63 também estão envolvidas na invasão dos macrófagos através da ligação com receptores CR1, CR3 e o sítio lectina-símile e CR3 e o da fibronectina, respectivamente (CUNNINGHAM, 2002; HANDMAN E BULLEN, 2002)

Outros receptores, como o da manose-fucose, o CR4 e o da proteína C reativa também auxiliam a fagocitose das promastigotas pelos macrófagos do hospedeiro (HANDMAN E BULLEN, 2002). Esses receptores também podem estar envolvidos na penetração das promastigotas nas células de Langerhans da pele (CUNNINGHAM, 2002). Adicionalmente, as promastigotas interagem com outras proteínas séricas para ativar o complemento, facilitando, então, sua fagocitose pelos macrófagos do hospedeiro (CUNNINGHAM, 2002).

Nas células dendríticas a internalização das *Leishmanias* se dá pela opsonização do parasito com anticorpo IgG e interação via receptores da porção FC de anticorpo (Fc γ RI/III) (reviewed KAUTZ-NEU *et al.*, 2012).

Após a ligação aos macrófagos, as promastigotas sofrem endocitose para o fagossomo, que posteriormente, pela fusão com o lisossomo, se transforma em fagolisossomo - um compartimento ácido rico em peptídeos microbicidas e enzimas hidrolíticas (CUNNINGHAM, 2002; HANDMAN E BULLEN, 2002). Antígenos da *Leishmania*, a exemplo do LPG estão relacionados a inibição da ativação dos mecanismos oxidativos e de vias de transdução de sinal, favorecendo a sobrevivência do parasito nos fagócitos (HANDMAN E BULLEN, 2002).

Ao sobreviverem aos mecanismos de eliminação do hospedeiro, as formas amastigotas, se multiplicam por divisão binária e causam, eventualmente, a lise dos macrófagos infectados. Assim, as amastigotas são liberadas e podem infectar células dendríticas e macrófagos vizinhos, recomeçando o ciclo (CUNNINGHAM, 2002).

2.2 IMUNOPATOGÊNESE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Do ponto de vista histopatológico as lesões da leishmaniose cutânea (LC) são caracterizadas por um processo inflamatório com linfócitos e plasmócitos, presença ou não de células gigantes e com raros ou até mesma ausência de parasitos (BITTENCOURT E BARRAL, 1991; reviewed COSTA *et al.*, 2009). Apesar de existir uma resposta imune do tipo Th1 protetora, os pacientes evoluem para a doença.

Evidências vêm sendo acumuladas de que a resposta imune exacerbada é a principal causa da lesão tecidual da leishmaniose tegumentar: 1) Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LC produzem níveis altos de IFN- γ e TNF existindo uma associação entre produção de IFN- γ e TNF e tamanho da lesão assim como o aparecimento de formas mais graves da doença (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; ANTONELLI *et al.*, 2005). 2) Células de pacientes com LC quando estimuladas com antígeno de *L. braziliensis in vitro* produzem pouco ou não produzem IL-10 (BACELLAR *et al.*, 2002). 3) Os níveis de TNF e IFN- γ no soro e em sobrenadantes de culturas de células estimuladas com o antígeno de *Leishmania* diminuem significativamente após o tratamento (DA-CRUZ *et al.*, 1996; RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; BACELLAR *et al.*, 2002; ANTONELLI *et al.*, 2005). 4) Indivíduos sub-clínicos, isto é, com teste sorológico e reação de Montenegro positivos mas que não apresentam lesões na pele, apresentam menores níveis de IFN- γ , TNF frente à exposição a antígenos de *Leishmania* quando comparados com os pacientes sintomáticos (FOLLADOR *et al.*, 2002; CARDOSO *et al.*, 2015).

Desse modo mecanismos imunológicos na leishmaniose levam à destruição celular e tecidual, culminando com o aparecimento da úlcera leishmaniótica que é a manifestação clínica mais importante na LC. A resposta imune exacerbada do tipo Th1, ao mesmo tempo que é importante para ativação dos macrófagos e eliminação da *Leishmania* é a principal responsável pela patogênese da doença, principalmente no que se refere à lesão tecidual (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; BACELLAR *et al.*, 2002).

2.3 PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA PATOGÊNESE DA LC

Os eventos iniciais na infecção pela *Leishmania*, envolvendo os macrófagos e as células dendríticas na apresentação de antígenos do parasito para células T e na produção de citocinas, devem influenciar na resposta do hospedeiro e no curso da infecção. As células dendríticas (DCs) desempenham importantes funções na interface entre a imunidade inata e adaptativa (DE SAINT-VIS *et al.*, 1998). São reconhecidas pela capacidade de sensibilizar linfócitos T não primados, e por contribuírem para a diferenciação funcional de células T regulatórias (YAMAZAKI *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que o contato das células dendríticas com as células NK induz atividade citolítica e produção de INF- γ por esta última (FERNANDEZ *et al.*, 1999). Por outro lado, células NK ativadas por IL-12 induzem a maturação de células dendríticas, levando a produção de mais IL-12 pelas mesmas e este efeito aumenta a capacidade das DCs de estimular linfócitos T CD4⁺ a se diferenciarem em Th1, que irão produzir INF- γ (KANE E MOSSER, 2000; GEROSA *et al.*, 2002).

A resposta imune induzida pelas células dendríticas *in vitro* ou em modelo experimental de infecção destas células com *Leishmania* varia de acordo com a espécie do parasito. Em DCs humanas derivadas de monócitos (MoDCs) infectadas com *L. amazonensis* observou-se uma redução na expressão de CD1a e CD80, bem como uma menor produção de IL-6 (FAVALI *et al.*, 2007). Por outro lado, Sanabria e cols. (2008) mostraram que a infecção de DCs por amastigotas de *Leishmania braziliensis* induziu uma maior expressão de CD11c e CD40 quando comparadas com DCs infectadas com *L. amazonensis* (SANABRIA *et al.*, 2008).

A infecção de células dendríticas de camundongos por promastigotas de *L. braziliensis* induz a produção de altos níveis de TNF, o que pode contribuir para uma resposta local de controle parasitário (CARVALHO *et al.*, 2008). Tsagozis e cols., (2004) observaram que camundongos BALB/c infectados com *L. major* tiveram uma redução na formação das lesões e da carga parasitária ao serem imunizados com células dendríticas pulsadas com peptídeos sintéticos ou nativos de gp63 de *Leishmania sp.* (TSAGOZIS *et al.*, 2004). Adicionalmente, Carvalho mostrou que DCs no ambiente da infecção que não estavam infectadas e foram estimuladas por fatores solúveis do parasito apresentavam-se mais ativadas e com maior capacidade

de apresentar antígenos aos linfócitos T, podendo favorecer a formação de uma resposta imune efetora (CARVALHO *et al.*, 2008).

2.4 PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS T NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Os linfócitos T tem uma participação importante na resposta imune do hospedeiro a LC: eles são decisivos para cura e geração de uma resposta imune protetora ao mesmo tempo em que são responsáveis pela persistência da doença e a sua patologia (CHOI e KROPF, 2009). Essa resposta é caracterizada pelo aumento de células T CD4⁺, apresentando um perfil principalmente de citocinas do tipo Th1 (BACELLAR *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2006; KEDZIERSKI *et al.*, 2010). O padrão de resposta imune do tipo 1 com produção de IFN- γ , TNF e IL-12, tem sido associado com o controle da infecção por ativação macrófagica e destruição parasitária na leishmaniose humana (ROBERTS *et al.*, 2006; AMEEN *et al.*, 2010;). A citocina IFN- γ atua em sinergismo com TNF ativando a óxido nítrico sintase a produzir óxido nítrico (NO), resultando na morte intracelular do parasito e controle da doença (BOGDAN *et al.*, 2000; NYLEEN *et al.*, 2010). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β , consideradas do tipo 2 e regulatórias, favorecem a multiplicação parasitária, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ podendo também inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1 e sua consequente produção de IFN- γ e TNF (GOMES-SILVA *et al.*, 2007, BARATTA-MASINI *et al.*, 2007). Tem sido descrito outros subtipos de células T, como células T regulatórias (Treg) e células Th17 que também parecem apresentar papel importante na susceptibilidade e resistência a LC (GOLLOB *et al.*, 2008; KEDZIERSKI *et al.*, 2010; NYLÉN *et al.*, 2010).

As células T regulatórias (Treg) parecem estar envolvidas na tolerância imunológica durante a infecção humana com *Leishmania*. Linfócitos Treg com funções imunossupressoras foram identificadas em lesões de pele de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis*, mas seu papel exato na patogênese não está completamente elucidado (BOURREAU *et al.*, 2009).

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ atuam como fonte produtora de citocinas envolvidas no processo de ativação de macrófagos (DA-CRUZ *et al.*, 2002). Normalmente se

observa uma predominância de linfócitos T CD4⁺ em pacientes com LC ativa e diferentes grupos (COUTINHO *et al.*, 2002; DA-CRUZ *et al.*, 2002) propuseram que no processo de cura após terapêutica é importante um balanço entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, onde os linfócitos T CD4⁺ teriam suas proporções reduzidas. Trabalhos sugerem a hipótese que linfócitos T CD8⁺ estão envolvidos em mecanismos imunoprotetores na LC e com o estabelecimento de um padrão do tipo 1, com produção de IFN- γ , sendo uma célula importante para o processo de resistência e cura da doença (MENDONÇA *et al.*, 1995; BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; GOLLOB *et al.*, 2008; KEDZIERSKI *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2015). Entretanto o estudo realizado por Santos e cols. (2013) mostrou a dicotomia dos linfócitos T em pacientes com leishmaniose cutânea, onde os linfócitos T CD8 (+) granzima B (+) estariam presentes nas lesões teciduais em humanos sendo responsáveis pelo processo necrótico devido a produção de marcadores citolíticos, enquanto que os linfócitos T CD4 (+) IFN- γ (+) seriam responsáveis pela eliminação da *L. braziliensis* nos macrófagos (Santos C da *et al.*, 2013).

Entende-se que a resposta Th1 seja importante para o controle da infecção, porém as citocinas Th1 podem também estar relacionadas com a patogênese da doença. Por isso é importante a existência de um equilíbrio entre as células Th1 e T regulatórias, e não uma polarização para um tipo de resposta, pois esses mecanismos são importantes para manter a integridade tecidual do hospedeiro contra uma resposta inflamatória exacerbada (REIS *et al.*, 2006; BARATTA-MASINI *et al.*, 2007).

Nos indivíduos subclínicos (SC) foi observado menor produção de granzima B nos linfócitos T CD8⁺ comparados aos dos pacientes com LC (CARDOSO *et al.*, 2015). Adicionalmente, nestes indivíduos SC a frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ expressando INF- γ é menor que as células de indivíduos com LC (MUNIZ *et al.*, 2016).

2.5 INTERAÇÃO ENTRE AS CÉLULAS DENDRÍTICAS E LINFÓCITOS T

As DCs podem influenciar na resposta dos linfócitos T CD4⁺ tanto do tipo 1 (Th1) como do tipo 2 (Th2) (MOSER *et al.*, 2000). A eficiência de DCs em induzir resposta Th1 parece ser dependente da produção de IL-12 por DCs maduras e possivelmente

por outras vias como pela produção de IL-23 (OPPMANN *et al.*, 2000). A resposta do tipo Th2 pode também ser dependente de DCs. Vários patógenos como *Schistosoma sp.* e fungos utilizam as DCs para indução de resposta Th2. Esta resposta Th2 parece ser resultante da ação de alguns antígenos parasitários sobre as DCs (D'OSTIANI *et al.*, 2000; MACDONALD *et al.*, 2001; BACCI *et al.*, 2002).

Desta forma, DCs e seus subgrupos tem capacidade de responderem rapidamente e de várias maneiras à estímulos do meio em que se encontram. Além de participarem da resposta imune como anteriormente citado, as DCs também participam da indução de tolerância periférica. As DCs nos linfonodos endocitam e processam antígenos formando complexos MHC-peptídeo no estado de repouso. Linfócitos T que respondem a esse complexo com resposta proliferativa são eliminados, representando um mecanismo pelo qual as DCs contribuem para a manutenção da tolerância periférica (LIU *et al.*, 2002). Além deste mecanismo, as DCs podem contribuir para a tolerância induzindo células T regulatórias e supressoras. Culturas de DCs imaturas derivadas de monócitos podem induzir células T CD4⁺ produtoras de IL-10 (JONULEIT *et al.*, 2000), enquanto já foi demonstrado que DCs plasmocitóides tem a propriedade de induzir células T CD8⁺ produtoras de IL-10, portanto contribuindo para a tolerância (GILLIET *et al.*, 2002). Em humanos, a injeção de DCs imaturas pulsadas com peptídeo leva à formação de células T CD8⁺ regulatórias específicas ao antígeno (DHODAPKAR *et al.*, 2002). Além disso, novas evidências demonstram que DCs são capazes de expandir também células T CD4⁺CD25⁺ supressoras (YAMAZAKI *et al.*, 2003).

2.6 IMUNOTERAPIA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A forte associação entre a resposta imune do hospedeiro e a patogenia da infecção por *Leishmania* faz com que a modulação da resposta imune seja uma das estratégias mais estudadas para o controle e a prevenção da leishmaniose.

A falência terapêutica observada com tratamento convencional de Leishmaniose com o antimonial pentavalente (Sb^v) em todas as formas clínicas de leishmaniose e as reações adversas relacionadas a dose e duração do tratamento apontam para a necessidade de novas estratégias para o tratamento dessa doença. As observações de que a imunoterapia adjuvante, além de diminuir o tempo de cicatrização das

lesões, é efetiva para o tratamento de formas resistentes tornam essa perspectiva terapêutica a mais promissora atualmente.

Embora a maioria dos pacientes sejam curados com o uso de antimonial, a necessidade de usar doses elevadas e por um longo período de tempo (30 dias) muitas vezes resulta no aparecimento de toxicidade, que pode impedir a manutenção da droga. Adicionalmente, muitos pacientes podem precisar de nova série de tratamento, aumentando a incidência de efeitos colaterais e o custo do tratamento. Falha terapêutica tem sido relatada em até 37% dos casos (SAENZ *et al.*, 1991), enquanto um estudo realizado em Corte de Pedra/BA documentou que 17% dos pacientes com leishmaniose tegumentar, causada por *L. braziliensis*, tratados com Sb^v, apresentam recidiva em períodos variáveis de tempo (NETTO *et al.*, 1990). Diversos efeitos colaterais têm sido associados ao uso de Sb^v, incluindo atralgia, mialgia, dor abdominal, náuseas, cefaléia, cardiotoxicidade, elevação de enzimas hepáticas e de enzimas pancreáticas.

Associação de alguns imunomoduladores com a terapia clássica tem sido estimulada, no sentido de diminuir o tempo de cura da doença, aumentando o processo de cicatrização da lesão. Desse modo, algumas alternativas terapêuticas vêm sendo utilizadas. O imiquimod é um imunomodulador para uso tópico como creme. Esta droga exibe atividade antiviral *in vitro* em modelos experimentais. Tem sido utilizada para o tratamento de verrugas genitais por HPV (COX *et al.*, 2004). O imiquimod foi efetivo para o tratamento da leishmaniose induzida em camundongos e *in vitro* ativa macrófagos contra a *Leishmania* (BUATES E MATLASHEWSKI, 1999). Estudo mostrou que pacientes com leishmaniose cutânea resistentes ao tratamento com antimonial isolado mostrou cura clínica em 90% dos pacientes seguidos com associação do antimonial ao tratamento tópico com imiquimod (AREVALO *et al.*, 2001). Porém, esses pceintes apresentaram os seguintes efeitos colaterais atribuíveis ao imiquimod: eritema ligeiro a moderado (40%), edema (30%) e sensações de queimadura (10%) (AREVALO *et al.*, 2001). Além disso, foi realizado um ensaio com o tratamento primário da leishmaniose cutânea com imiquimod o qual foi observado um sucesso limitado (AREVALO *et al.*, 2001). Uma maior frequência de pacientes tratados com o imiquimod associado ao antimonial alcançou a cura clínica após o fim do tratamento em relação ao grupo tratado apenas com o Sb^v (MIRANDA-VERÁSTEGUI 2005). Entretanto, no grupo tratado com o adjuvante

foi mais comum a ocorrência de eritema em relação aos tratados com Sb^v sozinho. Outros efeitos adversos também foram relatados em ambos os grupos como edema, prurido, queimadura e dor (MIRANDA-VERÁSTEGUI 2005).

Atualmente, a imunoterapia com vacinas e a modulação da resposta imune, através do uso de citocinas e fatores de crescimento, constituem alternativas promissoras na profilaxia e no tratamento da Leishmaniose Cutânea. Pesquisas de novas modalidades terapêuticas para o tratamento das leishmanioses têm sido empreendidas para tentar diminuir os efeitos colaterais que ocorrem com o uso de antimonial e anfotericina B, facilitar o tratamento nas áreas endêmicas da doença, diminuir o tempo de tratamento e os índices crescentes de falha terapêutica. Diante desse quadro e das dificuldades de tratamento é que a imunoterapia associada passa a ser uma alternativa a ser explorada.

Estudos prévios têm mostrado que o factor estimulador de colônia de granulócitos e mononuclear recombinante (rhGM-CSF), que é uma glicoproteína com papel importante no crescimento de células hematopoiéticas induzindo o crescimento de colônias maduras de granulócitos e/ou macrófagos (METCALF E BURGESS, 1982), pode alterar a resposta imune à *Leishmania* em humanos, por aumento da ativação macrofágica, indução de cicatrização e fibrose, e/ou por indução de uma resposta imune Th1 levando a uma apresentação mais eficaz de antígenos (LIESCHKE E BURGESS, 1992; JONES *et al.*, 1993; MANN *et al.*, 2006).

Estudos vêm demonstrando que o rhGM-CSF desempenha papel importante não só na velocidade de formação de cicatriz, quanto na sua qualidade (ALMEIDA *et al.*, 1999; MANN *et al.*, 2006). Almeida e cols. (1999) utilizando GM-CSF injetável nas bordas das úlceras de pacientes com LC, associado à administração endovenosa de antimonial, observaram uma redução em mais de 50% do tempo total de cura das lesões dos pacientes (ALMEIDA *et al.*, 1999). Outro estudo realizado pelo mesmo grupo mostrou que a administração de antimonial com curativo oclusivo de GM-CSF obtiveram cura de 100% dos cinco pacientes portadores de LC refratária (ALMEIDA *et al.*, 2005). No entanto, além da preparação tópica do rhGM-CSF não está disponível comercialmente, os custos elevados dessa medicação tornam difícil sua aplicação na prática clínica.

Esta modulação parece estar associada a produção de citocinas regulatórias como a IL-10, desde que estudo realizado por Lehmann (1998) demonstrou que GM-CSF é

capaz de aumentar em cerca de dez vezes a expressão de RNAm de IL-10, citocina imunomodulatória (LEHMANN *et al.*, 1998). Adicionalmente, o tratamento com GM-CSF e antimônio aumentou significativamente a produção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico em comparação ao grupo tratado com antimonial isoladamente.

A IL-10 é produzida por uma variedade de células, a exemplo dos linfócitos T CD4⁺, T CD4⁺CD25⁺, T CD8⁺, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (BELKAID *et al.*, 2002). Ela é uma potente moduladora da proliferação de linfócitos T CD4⁺ e da produção de citocinas antígeno-específicas do tipo Th1 por estas células, inibe a produção de óxido nítrico (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 CD80, CD86 (O'GARRA E VIEIRA, 2004).

Um estudo realizado por Faria e colaboradores mostrou que a diminuição da exposição *in situ* do receptor de IL-10, foi correlacionada com a resposta inflamatória exacerbada em pacientes com LM (FARIA *et al.*, 2005). A presença de um equilíbrio entre a produção de citocinas Th1 e Th2 e entre a resposta imune protetora e a modulação dessa resposta, como observada em indivíduos com a forma subclínica da infecção causada por *L. braziliensis* (FOLLADOR *et al.*, 2002), indica que a modulação da resposta imune pode ser fundamental para evitar o aparecimento de lesões teciduais nos indivíduos que estão expostos à infecção. O dano tecidual observado na leishmaniose cutânea e mucosa é também consequência da incapacidade do hospedeiro de controlar esta resposta. Esse fenômeno torna ainda mais relevante no contexto onde a refratariedade ao tratamento com antimonial pentavalente (Sb^v) e a presença da recidiva se associam aos diversos efeitos colaterais devidos ao uso parenteral de Sb^v ou anfotericina B, limitando o controle adequado da doença. Todos esses fatores ressaltam a importância de pesquisar novas modalidades terapêuticas que contribuam para facilitar o tratamento nas áreas endêmicas tendo como base o conhecimento dos mecanismos da imunopatogênese da LTA e como a imunoterapia pode contribuir para a prevenção da lesão inflamatória associada a essa doença ou diminuir no tempo de cura da lesão.

2.7 ANTÍGENOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI* COMO MODULADORES DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA NAS DOENÇAS DO TIPO Th1 E Th2

Evidências vêm sendo acumuladas de que a infecção crônica por helmintos, particularmente pelo *Schistosoma sp* ou produtos do parasito, é capaz de modular a resposta inflamatória do tipo Th2 das doenças de base alérgica, a exemplo da asma (CARDOSO *et al.* 2006; PACIFICO *et al.* 2009; CARDOSO *et al.* 2010; DE ALMEIDA *et al.*, 2017). Estudos realizados pelo nosso grupo do Serviço de Imunologia têm demonstrado que asmáticos infectados pelo *S. mansoni* residentes em áreas endêmicas em esquistossomose não responde aos testes cutâneos de alergia (ARAUJO *et al.*, 2000) possuem uma forma branda da doença (MEDEIROS *et al.*, 2003), e que células desses pacientes produzem concentrações mais baixas de citocinas do perfil Th2 e mais elevadas da citocina regulatória IL-10 em resposta a alérgenos, quando comparado com asmáticos não infectados (ARAUJO *et al.*, 2004). Foi demonstrado também que proteínas recombinantes do *S. mansoni*, a exemplo da proteína do tegumento do verme adulto, a rSm29 que induz a produção de IL-10 por células de asmáticos não infectados, sendo os macrófagos e as células T CD4⁺CD25⁺ as principais fontes dessa citocina (CARDOSO *et al.*, 2006). Em modelo murino de asma induzida pela ovalbumina, a injeção de rSm29 foi capaz de modular a resposta inflamatória alérgica pulmonar (CARDOSO *et al.* 2010).

Tem sido demonstrado que a infecção pelo *Schistosoma mansoni*, ou produtos do parasito, é também capaz de modular a resposta inflamatória do tipo Th1 envolvida tanto em algumas doenças auto-imunes, a exemplo do diabetes tipo I, artrite e psoríase (COOKE *et al.*, 1999; SEWELL *et al.*, 2002; LA FLAMME *et al.*, 2003; ATOCHINA E HARN, 2006) como infecciosas, a exemplo da infecção pelo HTLV-1 (LIMA *et al.* 2013, LIMA *et al.* 2017) e da leishmaniose (BAFICA *et al.* 2011; BAFICA *et al.* 2012; LOPES *et al.* 2014). O LNFPIII, um carboidrato encontrado no antígeno solúvel do ovo do *Schistosoma mansoni*, promove a resposta Th2 *in vivo*, o recrutamento de macrófagos moduladores (OKANO *et al.*, 2001), e a diferenciação de células dendríticas não primadas para o tipo 2 (DC-2), por uma via dependente de TLR-4 (THOMAS *et al.*, 2003). Em apoio aos achados deste trabalho, foi observado que um antígeno do *S. mansoni*, a fosfatidilserina, estimula o TLR-2 em indivíduos não primados (VAN DER KLEIJ *et al.*, 2004). Vabulas e cols.

demonstraram que a proteína HSP60 é também reconhecida pelo TLR-2 (VABULAS *et al.*, 2001), mas o papel dos TLR no reconhecimento de proteínas ainda não está totalmente elucidado.

Algumas doenças parasitárias também decorrem da exacerbação da resposta imune do eixo Th1/inflamatória. É o caso da leishmaniose tegumentar. A resposta imune celular do tipo Th1, com produção de IFN- γ é importante para eliminação da *Leishmania sp*, pela estimulação macrofágica que resulta em elevada produção de radicais do oxigênio e do nitrogênio, além da produção de TNF por essas células (BACELLAR *et al.*, 2002). Por outro lado, essa resposta quando exacerbada está associada à destruição tecidual na leishmaniose cutânea e mucosa (BACELLAR *et al.*, 2002). Os eventos iniciais na infecção pela *Leishmania sp*, envolvendo os macrófagos e as células dendríticas na produção de citocinas e na apresentação de antígenos do parasito para células T, devem influenciar na resposta do hospedeiro e no curso da infecção (DE SAINT-VIS *et al.*, 1998). Portanto, o ambiente celular, associado ao perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é importante para controlar a multiplicação parasitária sem causar danos ao hospedeiro (BELKAID, 2003; CARVALHO *et al.*, 2005). Neste sentido, Báfica e cols. demonstraram que a adição de antígenos de *S. mansoni* (rSm29, rSmTSP-2 e PIII) em culturas de PBMC de pacientes com LC foi capaz de diminuir a produção das citocinas TNF e INF- γ e aumentar a produção de IL-10 por estas células (BAFICA *et al.*, 2011). Em seguida Báfica e cols. (2012) mostraram que monócitos de pacientes com LC estimulados com antígenos de *S. mansoni* apresentaram menor expressão de HLA-DR comparados as células não estimuladas. Ainda neste estudo, nas culturas de PBMCs estimuladas pelos antígenos de *S. mansoni* foram observadas maior frequência de linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺ e CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ em relação as culturas não estimuladas (BAFICA *et al.*, 2012).

Estudo prévio do nosso grupo mostrou ainda que a adição do rSm29 a culturas de MoDCs de pacientes com LC estimuladas com o antígeno solúvel de *L. braziliensis* (SLA) apresentaram uma maior expressão da molécula de maturação, CD83 e das moléculas co-estimulatórias, CD80 e CD86, bem como maior frequência de MoDCs expressando IL-10 e IL-10R, em relação as células não estimuladas ou estimuladas apenas com SLA (LOPES *et al.*, 2014).

Desde que, na leishmaniose as células dendríticas são uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias, e que antígenos de *S. mansoni* são capazes de modular a exacerbação dos processos inflamatórios nas doenças imuno-mediadas, estes antígenos poderiam ser testados quanto a capacidade de modularem as funções das células dendríticas de pacientes com leishmaniose infectadas pelas *Leishmania braziliensis*.

No presente estudo foi utilizada a proteína recombinante do *S. mansoni*, rSm29 na tentativa de modular a resposta inflamatória das células dendríticas e de linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea. O antígeno rSm29 é uma glicoproteína localizada no tegumento do verme adulto (CARDOSO *et al.*, 2006). Dados progressos obtidos pelo grupo da Imunologia do SIM, UFBA, demonstraram que esta proteína induz a produção de IL-10 por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*. Os resultados poderão fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de doenças que cursam com a ativação excessiva ou inapropriada da resposta imune, a exemplo da LTA.

3 HIPÓTESE

O antígeno rSm29 do *S. mansoni* é capaz de modular negativamente a ativação e a produção de citocinas inflamatórias por células dendríticas derivadas de monócitos e por linfócitos de indivíduos com leishmaniose cutânea e conseqüentemente regular a inflamação exacerbada observada na leishmaniose cutânea.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade do antígeno rSm29 do *S. mansoni* em induzir o perfil regulatório nas células dendríticas derivadas de monócitos e linfócitos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Em culturas de MoDCs de pacientes com leishmaniose cutânea, infectadas com *L. braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos avaliar o efeito da adição do antígeno recombinante rSm29 sobre:

1. O perfil das moléculas de maturação (CD83), ativação (HLA-DR e CD1a), co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD40), regulação (IL-10R) e de citocinas (IL-12, TNF e IL-10) nas MoDCs (CD11c⁺);
2. O efeito do bloqueio de IL-10 sobre as moléculas de ativação, co-estimulatórias e regulatórias nas MoDCs estimuladas pelo rSm29;
3. A produção de citocinas (IL-10, TNF e IL-12 e INF- γ) no sobrenadante das culturas;
4. A infectividade das células dendríticas derivadas de monócitos pela *Leishmania braziliensis*;
5. O perfil das moléculas de superfície (CD28, CD40L, CTLA-4 e CD25) nos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺.

4.2.2 Avaliar as moléculas de superfície e a susceptibilidade de células dendríticas co-cultivadas com linfócitos, *in vitro*, de indivíduos com esquistossomose infectadas pela *Leishmania braziliensis*.

5 CAPÍTULO 1: Manuscrito 1: Efeito do antígeno rSm29 do *Schistosoma mansoni* *in vitro* sobre o perfil de células dendríticas e linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea

Diego Mota Lopes^{1,2}, Sérgio C. Oliveira^{3,4}, Jamille S. Fernandes^{1,2}, Edgar M. Carvalho^{3,5}, Luciana Santos Cardoso^{1,3,6}

¹Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia. ²Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT –DT/CNPq), Salvador, Bahia, Brasil. ⁴Departamento de Bioquímica e Imunologia. Instituto de ciências Biológicas. ⁵Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA. ⁶Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFBA.

Apoio Financeiro: INCT-DT (CNPq/MST), FAPESB (APP0015/2011), CNPq e NIH: AI30639-20.

* Autor para correspondência: Luciana Santos Cardoso. Serviço de Imunologia, HUPES, UFBA. Rua João das Botas, S/N, 5º andar, Canela, Salvador-Bahia, Brasil. CEP 40110.160. Phone: 55-71-3237-7353. FAX: 55-71-3245-7110. e-mail: lucianac@ufba.br

RESUMO

A resposta imune efetora na leishmaniose cutânea é predominantemente do tipo Th1/inflamatória, porém, quando exacerbada é responsável pela patogênese das lesões ulceradas. Tem sido demonstrado que a infecção pelo *Schistosoma mansoni*, ou produtos do parasito, é capaz de modular a resposta inflamatória exacerbada envolvida em algumas doenças imuno-mediadas. Neste contexto, sendo as células dendríticas fontes de citocinas pró e anti-inflamatórias e por apresentarem antígenos parasitários às células T, sua ação influencia diretamente a resposta imune do hospedeiro e o curso da infecção. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do antígeno rSm29 do *S. mansoni* em induzir um perfil regulatório nas células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) de pacientes com LC e consequentemente regular *in vitro* a resposta imune inflamatória na leishmaniose cutânea. A expressão de moléculas de superfície e citocinas intracelulares nas MoDCs e linfócitos e a proliferação da *Leishmania braziliensis* foram avaliadas por citometria de fluxo. Os níveis das citocinas IL-10, IL-12p40, INF- γ e TNF foram avaliados nos sobrenadantes das culturas por ELISA. Foi observado que a adição de rSm29 aumentou a frequência de MoDCs expressando a molécula de maturação CD83, co-estimulatórias CD80 e CD86 e de regulação IL-10R em comparação com culturas não estimuladas. Observamos que a adição de rSm29 diminuiu a frequência de linfócitos T CD4 e CD8 expressando CD28 nas culturas de MoDCs infectadas pela *L. braziliensis* em comparação com culturas não estimuladas. Além disso, a adição do rSm29 aumentou a frequência de linfócitos T CD4⁺CD25^{high} e CD4⁺CTLA-4⁺. Também foi observado um aumento na frequência de linfócitos CD8⁺CTLA-4⁺, comparados as culturas de MoDCs não estimuladas. A adição de rSm29 às culturas aumentou os níveis de IL-10 e diminuiu os níveis de IL-12p40 e INF- γ , ao tempo em que não alterou os níveis de TNF em comparação às culturas não estimuladas. Quanto à infecção e proliferação de *Leishmania braziliensis* nas MoDCs não foi observado aumento nas culturas estimuladas com rSm29 em relação às culturas não

estimuladas. O antígeno rSm29 foi capaz de aumentar a expressão de marcadores de ativação nas MoDCs, além da frequência de moléculas associadas a resposta regulatória nestas células e nos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, além disso aumentou IL-10 nos sobrenadantes das co-culturas de MoDCs+linfócitos. A regulação da resposta imune *in vitro* nesta ativação não convencional das MoDCs estimuladas pelo rSm29 sugere que este antígeno tem potencial para induzir uma resposta imune equilibrada desejável no controle da LC.

Palavras-chaves: Leishmaniose, células dendríticas, linfócitos, *L. braziliensis*, antígeno rSm29.

5.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose cutânea (LC) é uma doença endêmica na América do Sul e Central, Oriente médio e Ásia central, causada por uma variedade de espécies de leishmanias. Considerada um problema de saúde pública no mundo, essa enfermidade registra altas incidências, apresentando 1,3 milhões de casos por ano e com aproximadamente mais de 200 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco (WHO, 2017). No Brasil em média, são registrados cerca de 21.000 casos/ano de leishmaniose cutânea, sendo as regiões Norte e Nordeste áreas endêmicas (BRASIL, 2017). A Bahia apresenta uma elevada incidência de leishmaniose (22/100.000 hab.) transmitida pela espécie *Leishmania braziliensis*, um parasito intracelular que causa um amplo espectro de doenças no homem, variando desde lesões cutâneas localizadas as formas disseminadas (JIRMANUS *et al.*, 2012; BRASIL, 2016). Cerca de 10% dos indivíduos residentes em áreas endêmicas apresentam teste de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania* positivo e não desenvolvem a doença, nestes indivíduos o desenvolvimento de uma resposta imune equilibrada parece ser a responsável pela proteção contra o aparecimento da lesão (BADARO *et al.*, 1986; DAVIES *et al.*, 1995). As diferentes manifestações clínicas da doença estão relacionadas a fatores intrínsecos do parasito, mas também fatores relacionados à resposta imune do hospedeiro. As lesões são caracterizadas por um processo inflamatório com predomínio de células mononucleares havendo poucos ou até mesma ausência de parasitos (BITTENCOURT E BARRAL, 1991; MORAES E SILVEIRA, 1994; reviewed COSTA *et al.*, 2009). Apesar de existir uma resposta imune predominante do tipo Th1, importante para a ativação dos macrófagos e eliminação parasitária, sabe-se que esta mesma resposta quando

exacerbada é a principal causa da lesão tecidual da leishmaniose cutânea (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; BACELLAR *et al.*, 2002). Desse modo, mecanismos imunológicos efetores na leishmaniose tegumentar levam à destruição celular e tecidual, culminando com o aparecimento da úlcera leishmaniótica que é a principal manifestação clínica na LC.

As células dendríticas (DCs) desempenham importantes funções na interface entre a imunidade inata e adaptativa (DE SAINT-VIS *et al.*, 1998). São reconhecidas pela capacidade de sensibilizar linfócitos T não primados, e por contribuírem para a diferenciação funcional de células T regulatórias (YAMAZAKI *et al.*, 2003). As células dendríticas da pele transportam o parasito do sítio da infecção aos linfonodos regionais (reviewed MOLL *et al.*, 2000). Durante esta migração, se diferenciam em células dendríticas maduras com potentes funções apresentadoras de antígeno e capacidade de ativar células T (LEON *et al.*, 2007; NG *et al.*, 2008). Neste contexto, as células dendríticas e os linfócitos têm um papel importante no direcionamento da resposta imune, principalmente pela produção de citocinas IFN- γ , TNF e IL-12, importantes na ativação macrófágica e destruição parasitária (ROBERTS *et al.*, 2006; AMEEN *et al.*, 2010). Tem sido descrito outros subtipos de células T, como células T regulatórias (Treg) e células Th17 que também parecem apresentar papel importante na susceptibilidade e resistência a LTA (GOLLOB *et al.*, 2008; NYLEN E GAUTAM, 2010; SAKTHIANANDESWAREN *et al.*, 2010). As células T regulatórias (Treg) parecem estar envolvidas na tolerância imunológica durante a infecção humana com *Leishmania*. Células Treg com funções imunossupressoras foram identificadas em lesões de pele de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis*, mas seu papel exato na patogênese não está completamente elucidado (BOURREAU *et al.*, 2009). Entende-se que a resposta Th1 seja importante para o controle da infecção, porém as citocinas Th1 podem também estar relacionadas com a patogênese da doença. Por isso é importante a existência de um equilíbrio entre as células Th1 e T regulatórias, pois esses mecanismos são importantes para manter a integridade tecidual do hospedeiro contra uma resposta inflamatória exacerbada (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; reviewed SCOTT E NOVAIS, 2016).

Evidências vêm sendo acumuladas de que a infecção crônica por helmintos, particularmente pelo *Schistosoma sp* ou produtos do parasito, é capaz de modular a resposta inflamatória do tipo Th1 envolvida em algumas doenças imuno-medidas, a

exemplo do diabetes tipo I, artrite reumatóide e da infecção pelo HTLV-1 (COOKE *et al.*, 1999; SEWELL *et al.*, 2002; LA FLAMME *et al.*, 2003; ATOCHINA E HARN, 2006). A resposta imune celular do tipo Th1 na Leishmaniose, com produção de IFN- γ é importante para eliminação da *Leishmania* (BACELLAR *et al.*, 2002). Por outro lado, essa resposta quando exacerbada está associada à destruição tecidual na leishmaniose cutânea e mucosa (BACELLAR *et al.*, 2002). Os eventos iniciais na infecção pela *Leishmania sp*, envolvendo os macrófagos e as células dendríticas na produção de citocinas e na apresentação de antígenos do parasito para células T, devem influenciar na resposta do hospedeiro e no curso da infecção (DE SAINT-VIS *et al.*, 1998). Portanto, o ambiente celular, associado ao perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é importante para controlar a multiplicação parasitária sem causar danos ao hospedeiro (BELKAID, 2003; CARVALHO *et al.*, 2005). Neste sentido, Bafica e cols. demonstraram que a adição do antígeno rSm29 de *S. mansoni* em culturas de PBMC de pacientes com LC foi capaz de diminuir a produção das citocinas TNF e INF- γ e aumentar a produção de IL-10 por estas células (BAFICA *et al.*, 2011). Outro estudo realizado por Bafica e cols. mostraram que monócitos de pacientes com LC estimulados pelo antígeno rSm29 + SLA apresentaram menor expressão de HLA-DR comparado as células estimuladas com SLA apenas (BAFICA *et al.*, 2012). Entretanto nessas culturas de PBMCs estimuladas com rSm29 + SLA foi observado uma maior expressão de CD28 nos linfócitos T CD8 nas culturas estimuladas com rSm29 + SLA em relação as estimuladas apenas pelo SLA (BAFICA *et al.*, 2012). Estudo prévios realizados pelo nosso grupo mostrou que MoDCs de pacientes com LC ao serem estimuladas com rSm29 e SLA expressam mais moléculas de maturação (CD83) e co-estimulatórias (CD80 e CD86), assim como mais IL-10 e IL-10R em relação as células não estimuladas ou estimuladas com SLA apenas (LOPES *et al.*, 2014).

Tem sido demonstrado que o uso de terapias imunomodulatórias associados ao Antimonial Pentavalente (Sb^V), principal droga de escolha, acelera a cicatrização tanto na leishmaniose cutânea como na leishmaniose mucosa (ALMEIDA *et al.*, 1999; LESSA *et al.*, 2001; CELES *et al.*, 2016). Neste contexto, a utilização do antígeno rSm29 associado ao Sb^V também pode ser uma nova estratégia terapêutica.

Desde que, na leishmaniose as células dendríticas são uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias, e que antígenos de *S. mansoni* são capazes de modular a exacerbação dos processos inflamatórios nas doenças imuno-mediadas, este estudo avaliou a capacidade do antígeno rSm29 do *S. mansoni* de induzir o perfil regulatório nas células dendríticas derivadas de monócitos e conseqüentemente regular a inflamação exacerbada *in vitro* observada na leishmaniose cutânea.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Seleção dos pacientes

Foram incluídos no estudo 12 pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea (LC), residentes na área endêmica de Corte de Pedra localizada na região Sudeste do Estado da Bahia. O diagnóstico foi realizado por médicos especialistas, levando-se em consideração o quadro clínico característico de LC, isolamento de parasitos após biópsia da lesão e o teste de hipersensibilidade positiva de tipo retardado (DTH) em resposta ao antígeno solúvel de *Leishmania* (GEIGER *et al.* 2004). Em caso de dúvidas, foram realizados exames histopatológicos da lesão e PCR para *Leishmania*. Não foram incluídos no estudo indivíduos que já haviam iniciado a terapia farmacológica ou que já foi realizado tratamento anterior para LC. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) (Parecer número: 0603110287514). O termo de consentimento informado foi obtido de todos os participantes do estudo ou de seus representantes legais. Dentre os indivíduos avaliados, 67% foram do sexo masculino e 37% do sexo feminino, com idade média de $33,5 \pm 14,5$ anos. Dos 12 pacientes, 42% apresentaram apenas uma lesão e 58% apresentaram entre duas e quatro lesões cutâneas.

5.2.2 Produção do antígeno recombinante rSm29 do *S.mansoni*

O antígeno recombinante do *Schistosoma mansoni*, rSm29, utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pelo Dr. Sergio C. Oliveira do Instituto de Ciências Biológicas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG. O gene que codifica a proteína rSm29 foi clonado em um plasmídeo em cepas competentes de *E. coli* e testada quanto à presença de lipopolissacarídeo (ROSENBAUM *et al.* 1985) utilizando um Kit Cromogênico comercialmente disponível (LAL, CAMBREX). Os níveis de LPS estavam abaixo do limite de detecção (dados não mostrados).

5.2.3 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico e isolamento dos monócitos e dos linfócitos

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) dos pacientes com leishmaniose cutânea foram obtidas através do gradiente de Ficoll-Hypaque (GE

Healthcare, Uppsala) e ajustadas para concentração de 1×10^7 células/mL em RPMI 1640 completo (100 μ L/mL de gentamicina, L-glutamina 2mM, 30mM HEPES), contendo 10% de Soro Fetal Bovino inativado (Life technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Os Monócitos (CD14⁺) foram isolados das CMSP utilizando-se Beads Magnéticas (Monocyte Isolation Kitt II human, MACS, Miltenyi Biotec) por seleção negativa, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3⁺, CD56⁺, CD16⁺, CD7⁺, CD19⁺ e Glycophorin A⁺. Os linfócitos resultantes da separação dos monócitos por BEADS magnéticas foram armazenados em -70°C em meio DMSO + 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) por sete dias para posterior co-cultivo com as MoDCs. A verificação da pureza da separação dos monócitos e linfócitos foi realizada pela marcação com anticorpo monoclonal anti-CD14, CD11c e CD3 e avaliadas por citometria de fluxo (Figura 1). Os monócitos foram positivos para CD14 e negativos para CD3 (Figura 1A). Adicionalmente, os monócitos apresentaram baixa expressão de CD11c (1,25%), uma vez que este marcador aumenta a sua expressão à medida que esta população diferencia em células dendríticas (Figura 1A). Para avaliar a pureza dos linfócitos foi realizada marcação com anticorpo anti-CD3 e anti-CD14, onde a população selecionada apresentou-se uma frequência média de 72% de células CD3⁺CD14⁻ (Figura 1C).

5.2.4 Diferenciação em células dendríticas derivadas de monócitos e co-cultivos com linfócitos autólogos

Após a separação, 2×10^6 monócitos (CD14⁺) foram incubados a 37°C, 5% de CO₂ por 7 dias com 3mL/poço de RPMI completo contendo 800 UI/mL de IL-4 (R&D Systems) e 50ng/mL de GM-CSF (Peprotech), para diferenciação em células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs). Após 7 dias de cultura, as MoDCs foram coletadas lavando-se os poços 3x com solução salina e ajustadas para a concentração de 3×10^5 células/mL para os experimentos de citometria de fluxo. As MoDCs foram estimuladas no sexto dia de diferenciação dos monócitos com 10 μ g/mL de rSm29 recombinante ou 100ng/mL de LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich) por 24 horas a 37°C em 5% CO₂.

5.2.5 Cultura das leishmanias e marcação com CFSE

As cepas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/2007/LTCP11245) foram isoladas de lesão de paciente com leishmaniose cutânea e inicialmente cultivadas em meio bifásico NNN (Neal, Novy, Nicolle da SIGMA-Aldrich). Em seguida, as formas promastigotas foram criopreservadas em nitrogênio líquido para posterior utilização. Após o descongelamento em banho-maria a 37°C, as promastigotas foram cultivadas a 23°C em meio Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) contendo 5% de soro fetal bovino inativado (Cripion Biotechnology, Brazil). Promastigotas metacíclicas foram obtidas da cultura na fase-estacionária (aproximadamente 5 a 7 dias) e foram utilizadas para infectarem as MoDCs. Antes da infecção, as Leishmanias foram incubadas com carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen) para posterior marcação dos parasitos e análise da proliferação por citometria de fluxo como descrito por Kamau e cols. (KAMAU *et al.*, 2001). Resumidamente, promastigotas de *L. braziliensis* foram lavadas em solução salina e novamente suspensas a 6×10^7 em 10mL de soro fisiológico com 5 μ M de CFSE, e incubadas a 37°C durante 10 minutos. Em seguida, os parasitos foram lavados duas vezes com solução salina contendo 10% de SFB e novamente suspenso em meio RPMI, estando prontos para serem utilizados para infecção.

5.2.6 Infecção das MoDCs com promastigota de *L. braziliensis*

As MoDCs que haviam sido estimuladas pelos antígenos por 24h, foram ajustadas para 3×10^5 e cultivadas com 15×10^5 Leishmanias, na proporção de 5 parasitos para 1 MoDC. As culturas de MoDCs com os parasitos foram incubadas por 2h a 37°C em 5% CO₂, e em seguida lavadas com RPMI 1640 completo (100 μ l/mL de gentamicina, L-glutamina 2mM, 30mM HEPES), contendo 10% de Soro Fetal Bovino inativado (Life technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) por 2 vezes afim de bloquear a infecção e retirar as Leishmanas que não foram internalizadas. Após este período foi realizado o co-cultivadas de 3×10^5 MoDCs com 30×10^5 linfócitos autólogos por 24 horas a 37°C em 5% CO₂, como explicado anteriormente.

5.2.7 Bloqueio de IL-10 nas culturas de MoDCs

Para avaliação do efeito do bloqueio da citocina IL-10 nas MoDCs, 3×10^5 células/mL foram cultivadas em estufa a 37°C , 5% CO_2 por 24 horas na presença do antígeno rSm29 ($10\mu\text{g/mL}$) e anticorpo neutralizante anti-IL-10 humano (10ng/mL clone JES3-19F1, BD Pharmingen™). Em seguida as MoDCs foram infectadas com *L. braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos como descrito anteriormente. As moléculas expressas na superfície das MoDCs em bloqueio ou na presença do anticorpo anti IL-10 foram avaliadas por citometria de fluxo. Para os experimentos de bloqueio utilizamos um n° de 4 pacientes.

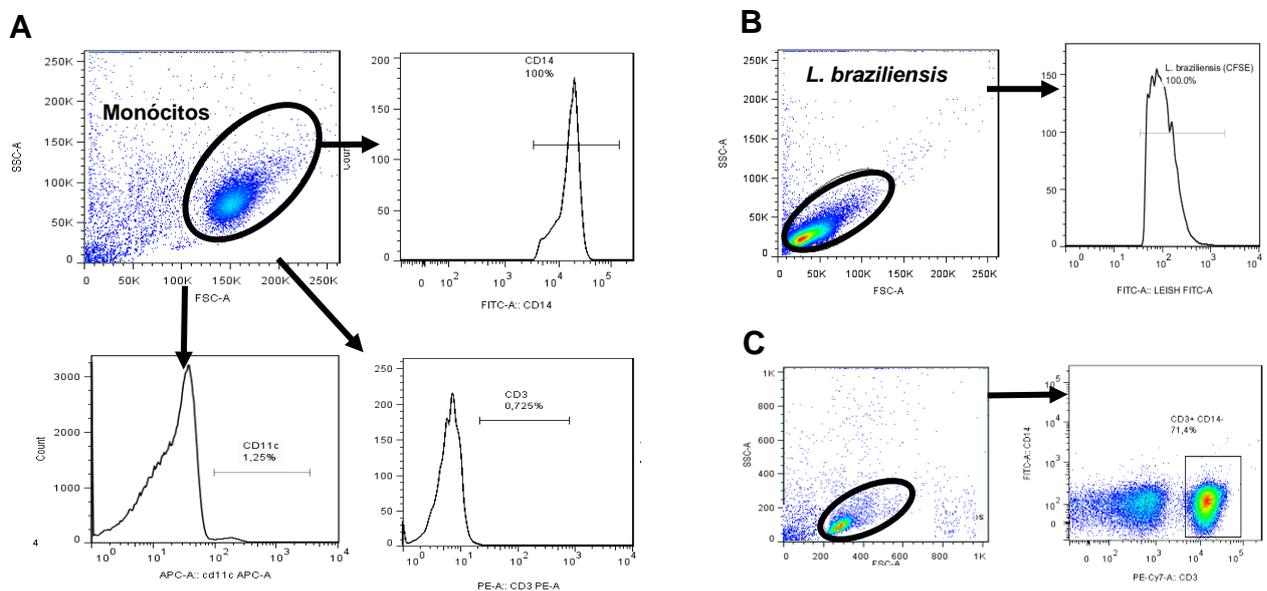


Figura 1. Isolamento de Monócitos (A) e linfócitos (C) por beads magenéticas e marcação da *Leishmania braziliensis* com CFSE (B).

5.2.8 Avaliação do fenótipo e do estado de ativação das células dendríticas após estímulo em cultura e infecção

As MoDCs infectadas ou não, e os linfócitos nas diferentes condições (sem estímulo, estimuladas com rSm29 ou com LPS) foram cultivadas por 24h a 37°C , 5% de CO_2 . Após a incubação, foram adicionados $20\mu\text{L/poço}$ de brefeldina diluída 10X ($10\mu\text{g/mL}$ - eBioscience) e realizada nova incubação sob as mesmas condições por 4 horas. As MoDCs foram ajustadas para 3×10^5 e então marcadas com os anticorpos monoclonais CD11c-APC (clone 3.9), CD1a-FITC (clone HI149), IL-10R α -PE (Polyclonal), CD40-PerCP-e Fluor 710 (clone 5C3), CD80-PerCP-e Fluor 710 (clone 2D10.4), CD86-PE (clone IT2.2), CD83-PE-Cy7 (clone HB15e), HLA-DR- PerCP-

Cy5.5 (clone LN3) (todos da eBioscience, California) e mantidas a 4°C por 20 minutos. Após a marcação das moléculas de superfície, os tubos que não tinham marcação intracelular foram lavados com PBS 1x e fixadas com 200µL de formaldeído a 2% em PBS e mantidas a 4°C até a hora da aquisição no FACS. Em seguida, os tubos que continham células para avaliação de citocinas intracelulares foram centrifugados e incubados com 150µl/poço do tampão de permeabilização, por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foi feita marcação intracelular, utilizando-se anticorpo monoclonal IL-12p40/70-FITC (clone 11.5), IL-10-PE (clone JES3-9D7) e TNF-PErCP Cy5.5 (clone MAb11), todos da eBioscience California, seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Em seguida foram feitas 2 lavagens utilizando-se o tampão de permeabilização, seguida de ressuspensão das células em 200µL de solução de lavagem (PBS 1x + Azida 1M+ BSA) e realizadas as leituras no FACS. Para avaliação fenotípica dos linfócitos foram realizadas marcações das células com anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície celular CD3-FITC (clone OKT3), CD4-PerCP-Cy5.5 (clone OKT-4), CD8-APC (clone OKT8), CD28-PE (clone CD28.2 (ORALL), CD25-PeCy7 (clone M-A251 (ORALL), CD152 (CTLA-4)-PE (clone 14D3), todos da eBioscience California e CD40L-PeCy7 (clone 24-31; Biolegend, California). A aquisição foi realizada utilizando-se o aparelho FACSCanto (Becton Dickinson), num total de 100.000 eventos.

As células dendríticas e os linfócitos foram analisados de acordo com a frequência da expressão dos marcadores de superfície celular utilizando-se o programa FlowJo™ (Tree Star, USA). As populações celulares foram definidas por fluorescência inespecífica a partir da dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) como parâmetros de tamanho e granulosidade celular, respectivamente. De acordo com as características celulares, foi feita a seleção das populações de MoDCs por janelas nestas populações (Figura 2A). A frequência das populações de MoDCs foram realizadas a partir da seleção das células CD11c⁺ (Figura 2B). A análise da população dos linfócitos T foi realizada pela seleção da população CD3⁺ e das subpopulações CD4⁺ e CD8⁺, utilizando-se o programa Flow-Jo (Figuras 2C e 2D, respectivamente).

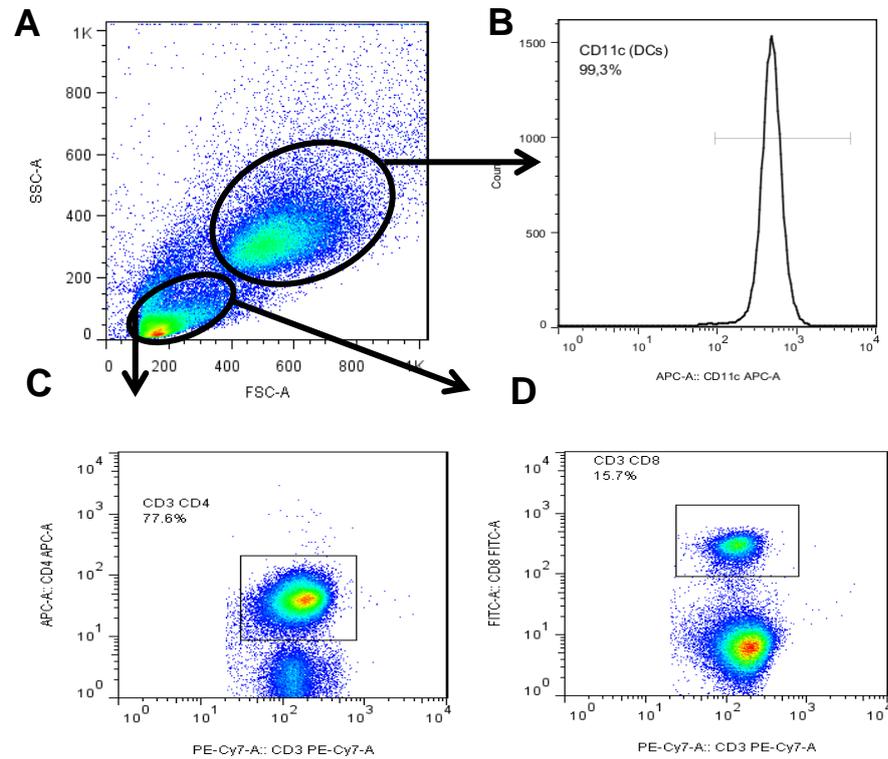


Figura 3. A figura representa a estratégia de seleção a partir de uma plot de densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) celular, identificando as populações de células dendríticas (superior) e linfócitos (inferior) que foram co-cultivados por 24h. A figura B representa o marcador de MoDCs (CD11c⁺) avaliado dentro da população de MoDCs e as figuras C e D as subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ ou T CD3⁺CD8⁺ avaliados dentro da população de linfócitos, respectivamente.

5.2.9 Determinação dos níveis de citocinas

Os níveis das citocinas IL-10, IL-12p40, INF- γ e TNF foram avaliados nos sobrenadantes das co-culturas de MoDCs e linfócitos, segundo informações do fabricante (Pharmingen, San Diego, CA). Resumidamente, placas (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp surface, Nalgene Nunc Int, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas durante 24h, a 4°C com anticorpo monoclonal anti-citocina humana (IL-10, IL-12p40, INF- γ e TNF) na concentração de 4 μ g/mL. No dia seguinte, após lavagem das placas com PBS Tween 0,05% foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com PBS + albumina bovina 0,01% por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas 3 lavagens com PBS / Tween 0,05%, e adicionando amostras, brancos e a curva-padrão que foram incubados à temperatura ambiente por duas horas. As placas foram lavadas novamente três vezes e adicionado o anticorpo de detecção anti-citocina humana biotilado (2 μ g/mL). Após incubar uma hora a temperatura ambiente as placas foram lavadas 4X e foi adicionado o conjugado (peroxidase conjugada à streptavidina). As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem adicionou-se o substrato (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina + H₂O₂ + dimetilsulfóxido) e as placas foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ (8M). A densidade óptica (D.O.) foi lida a 450nm (Spectramax, Molecular Devices Corporation Sunnyvale, CA.) e os valores convertidos em pg/mL baseando-se na curva padrão (Soft Max Pro 5.0 Molecular Devices Corporation Sunnyvale, CA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

5.2.10 Avaliação microscópica da infectividade das MoDCs pela *Leishmania braziliensis*

Para avaliação da taxa de infecção das MoDCs pela *L. braziliensis* na presença ou ausência do antígeno rSm29, foram realizadas lâminas confeccionadas por cytopspin (1000rpm, 1 minuto) e em seguida as lâminas foram coradas com corante Panótipo (Interlab). Foram avaliados o número de MoDCs infectadas e a quantidade de amastigotas por 100 células contadas. Para esta avaliação foram contadas 200 células por lâmina avaliadas por dois observadores independentes.

5.2.11 Análises estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA EUA). As diferenças entre as frequências de MoDCs e os níveis das citocinas dos pacientes com leishmaniose foram avaliadas por ANOVA não paramétrica (Teste de Friedman com pós teste de Dunns). As diferenças entre as frequências dos linfócitos e infectividade entre as MoDCs foram avaliadas com o teste T não pareado. As frequências de células positivas foram expressas em mediana (mínimo e máximo) da porcentagem ou a média de intensidade de fluorescência (MIF). As concentrações das citocinas foram expressas em média e desvio padrão (pg/mL). A significância estatística foi estabelecida no intervalo de confiança de 95%.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Avaliação fenotípica das moléculas associadas à maturação e apresentação antigênica nas células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) após estímulo pelo rSm29 e co-cultivadas com linfócitos autólogos

Avaliamos o efeito da adição do antígeno rSm29 na frequência da molécula associada a maturação celular (CD83), na expressão dos marcadores associados a ativação/apresentação antigênica (HLA-DR e CD1a), moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD40) nas células dendríticas derivadas de monócitos co-cultivadas com linfócitos autólogos (MoDCs-Li) de pacientes com leishmaniose cutânea (LC).

Nas culturas infectadas pela *L. braziliensis*, a adição do rSm29 levou a um aumento na frequência de células CD11c⁺CD83⁺ [44% (20-74)] comparadas às co-culturas não estimuladas [27% (13-63); *p<0,05] ou estimuladas com LPS [34% (18-59); *p<0,05, Figura 3A]. Nas culturas estimuladas com LPS, o aumento na frequência de células CD11c⁺CD83⁺ também foi observado nas MoDCs não infectadas [32% (9-65)] comparadas as culutras não estimuladas do mesmo grupo [18% (7-60); *p<0,05, Figura 3A]. Observamos uma aumento na frequência de células CD11c⁺CD83⁺ nas culturas estimuladas rSm29 de MoDCs infectadas pela *L. braziliensis* [44% (20-74)] comparadas as culturas não infectadas [29% (10-67); *p<0,05, Figura 3A].

Em relação a média de intensidade de fluorescência (MIF) de HLA-DR observamos que a adição do antígeno rSm29 não alterou o MIF de HLA-DR tanto nas culturas de MoDCs infectadas pela *L. braziliensis* [MIF: 87 (27-239)] como nas culturas não infectadas [MIF: 70 (10-246)], comparadas às culturas sem estímulo [MoDCs infectada: 63 (28-268); MoDCs não infectada: 72 (10-189), respectivamente] ou estimuladas com LPS [MoDCs infectada: 68 (27-252); MoDCs não infectada: 59 (10-207), respectivamente, Figura 3B).

Em relação a frequência de MoDCs expressando a molécula CD1a, apresentadora de antígenos lipídicos, observamos nas co-culturas infectadas pela *L. braziliensis* uma diminuição na frequência de CD11c⁺CD1a⁺ após estímulo com rSm29 [31% (16-68)], comparadas às culturas não estimuladas [39% (20-66); *p<0,05, Figura 3C]. Nas co-culturas MoDCs-Li não infectadas apenas a estimulação pelo LPS

apresentou uma redução na frequência de células CD11c⁺CD1a⁺ [22% (14-57)], quando comparadas as culturas não estimuladas [27% (16-65); $p < 0,05$, Figura 3C].

Em relação a frequência de MoDCs expressando as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 observou-se que a adição de rSm29 levou a um aumento na frequência destas moléculas nas culturas infectadas pela *L. braziliensis* [CD80 : 41% (23-67)]; CD86: 92% (66-97)] comparadas as culturas não estimuladas [CD80: 25% (19-54); CD86: 84% (41-95); $p < 0,05$, Figuras 3D e E, respectivamente]. Nestas culturas, o estímulo das MoDCs com LPS também levou a um aumento na frequência de células expressando CD80 [32% (21-66)] comparadas as culturas não estimuladas [25% (19-54); $*p < 0,05$, Figura 3D].

Nas co-culturas não infectadas a adição do antígeno rSm29 também levou a um aumento na frequência de CD11c⁺CD80⁺ [34% (20-85)] e de CD11c⁺CD86⁺ [79% (46-97)] quando comparadas às culturas não estimuladas [CD80: 21% (13-47); CD86: 65% (39-89); $*p < 0,05$, Figuras 3D e E, respectivamente]. Nas culturas não infectadas, o estímulo de MoDCs com LPS também levou a um aumento na frequência de células expressando CD80 [29% (21-66)] comparadas as culturas não estimuladas [21% (13-47); $*p < 0,05$, Figura 3D]. Observamos também que nas culturas estimuladas com LPS, houve um aumento na frequência de CD11c⁺CD86⁺ nas MoDCs infectadas [93% (60-97)] comparadas as MoDCs não infectadas [68% (52-90); $*p < 0,05$, figura 3E].

Em relação a frequência de CD11c⁺ expressando CD40 apenas nas co-culturas não infectadas pela *L. braziliensis* a adição do rSm29 levou a um aumento na expressão deste molécula [27% (14-70)], comparadas às culturas não estimuladas [22% (13-68); $*p < 0,05$. Figura 3F].

Nestas avaliações podemos observar que nas culturas estimuladas pelo Sm29 a infecção das MoDCs pela *Leishmania braziliensis* não foi capaz de diminuir o perfil de ativação destas células.

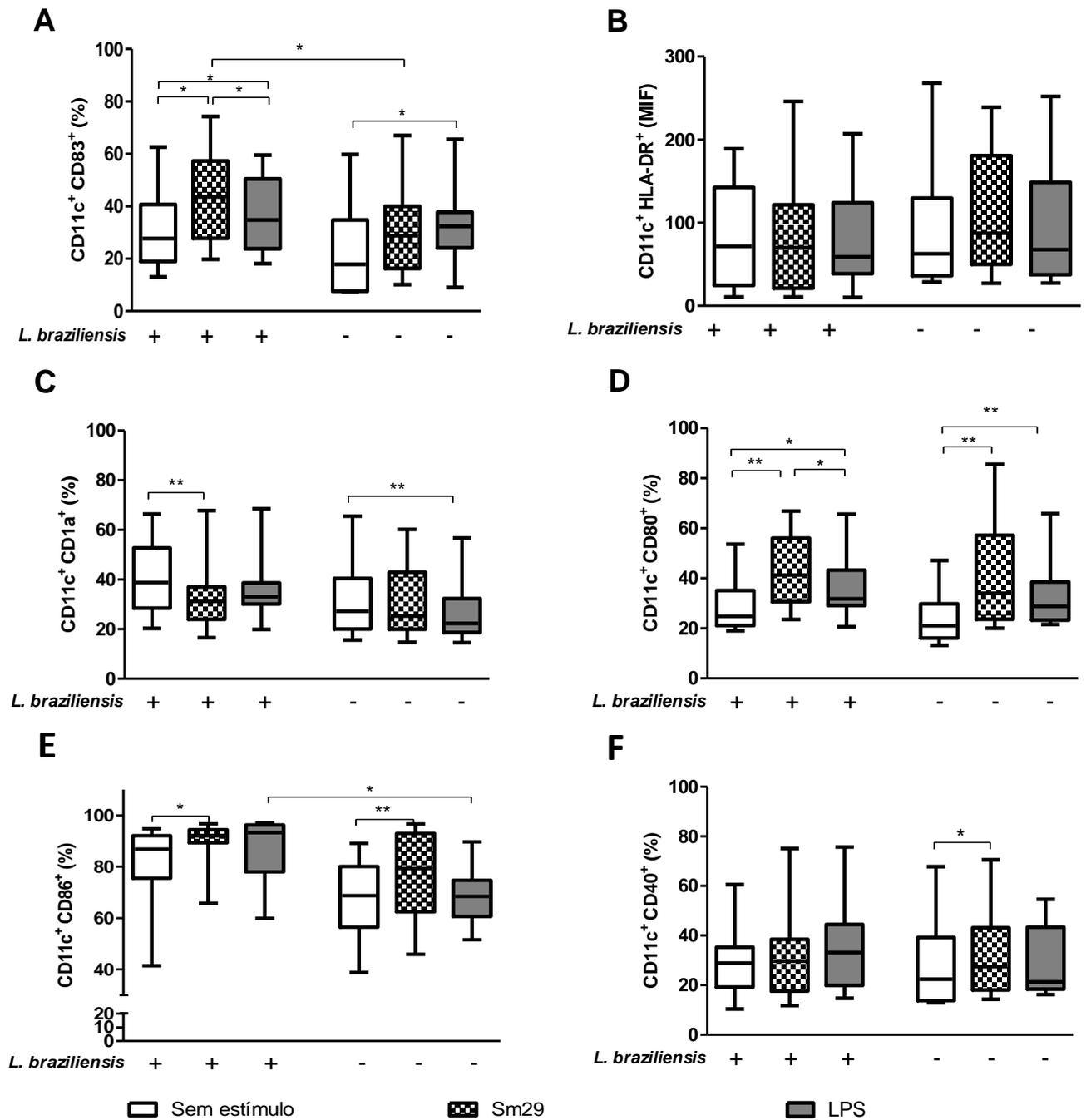


Figura 3. Expressão das moléculas associadas a apresentação antigênica (HLA-DR e CD1a), maturação (CD83) e co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) nas MoDCs estimuladas pelo rSm29 (10 μ g/mL) ou LPS (100ng/mL) e infectadas ou não pela *L. braziliensis*, co-cultivadas com linfócitos autólogos por 24h. (A) CD11c⁺CD83⁺ (%), (B) CD11c⁺HLA-DR⁺ (MIF), (C) CD11c⁺CD1a⁺ (%), (D) CD11c⁺CD80⁺ (%), (E) CD11c⁺CD86⁺ (%) e (F) CD11c⁺CD40⁺ (%). Os resultados são expressos como mediana, valores min. - max. e percentis. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$. Teste de Friedman.

5.3.2 Avaliação da frequência de MoDCs co-cultivadas com linfócitos autólogos expressando as citocinas intracelulares IL10, IL12, TNF

Em relação a frequência de MoDCs expressando a citocina regulatória IL-10 nas co-culturas infectadas pela *L. braziliensis* observamos que a adição de rSm29 foi capaz de aumentar a frequência de células CD11c⁺IL-10⁺ [6,7% (6,2-14)] comparadas às culturas não estimuladas [3,6% (2,4-8,9); **p<0,01, Figura 4A]. Quando avaliamos o IL-10 nas MoDCs não infectadas observamos que a adição de rSm29 também levou a um aumento na frequência de células expressando IL-10 [3,1% (2,0-4,8)] comparadas às culturas não estimuladas [1,5% (1,2-2,2)] ou estimuladas com LPS [2,2% (1,6-3,6); *p<0,05, Figura 4A].

Nas culturas infectadas, a frequência de células expressando IL-10 foi maior tanto sem estímulo (p<0,05), estimuladas com rSm29 (p<0,05) ou com LPS (p<0,05) em relação às culturas não infectadas correspondentes (Figura 4A).

Em relação à frequência de MoDCs expressando a citocina inflamatória TNF nas co-culturas infectadas pela *L. braziliensis* observamos que a adição de rSm29 não alterou a frequência de CD11c⁺TNF⁺ [11% (7-18)] comparadas às culturas não estimuladas [9% (8-19)] ou estimuladas com LPS [13% (8-28); Figura 4B]. Quando avaliamos o TNF nas culturas não infectadas observamos que a adição de rSm29 foi capaz de aumentar a frequência de células expressando TNF [13% (12-15)] comparadas às culturas não estimuladas [7% (5-8)] ou estimuladas com LPS [8% (6-16)]; *p<0,05, Figura 4B]. As culturas sem estímulo infectadas pela *L. braziliensis* apresentaram maior frequência de células CD11⁺TNF⁺ (p<0,05) comparadas às culturas não infectadas (p<0,05, figura 4B).

Em relação à frequência de MoDCs expressando a citocina pré-inflamatória IL-12, nas co-culturas infectadas pela *L. braziliensis* observamos que a adição de rSm29 diminuiu a frequência de CD11c⁺IL-12⁺ [15% (10-17)] comparadas às culturas não estimuladas [18% (16-20)]; *p<0,05; Figura 4C]. Por outro lado, nas culturas infectadas observamos um aumento de MoDCs expressando IL-12 quando estimuladas pelo rSm29 [18% (11-20)] ou LPS [14% (11-16)] em relação as culturas não estimuladas [8% (6-11)]; *p<0,05, Figura 4C]. Assim como observado pela frequência de células expressando IL-10 ou TNF, a frequência de células CD11c⁺IL-12⁺ foi maior nas culturas não estimuladas infectadas pela *L. braziliensis* (p<0,05) comparadas aquelas não infectadas (p<0,05, figura 4C).

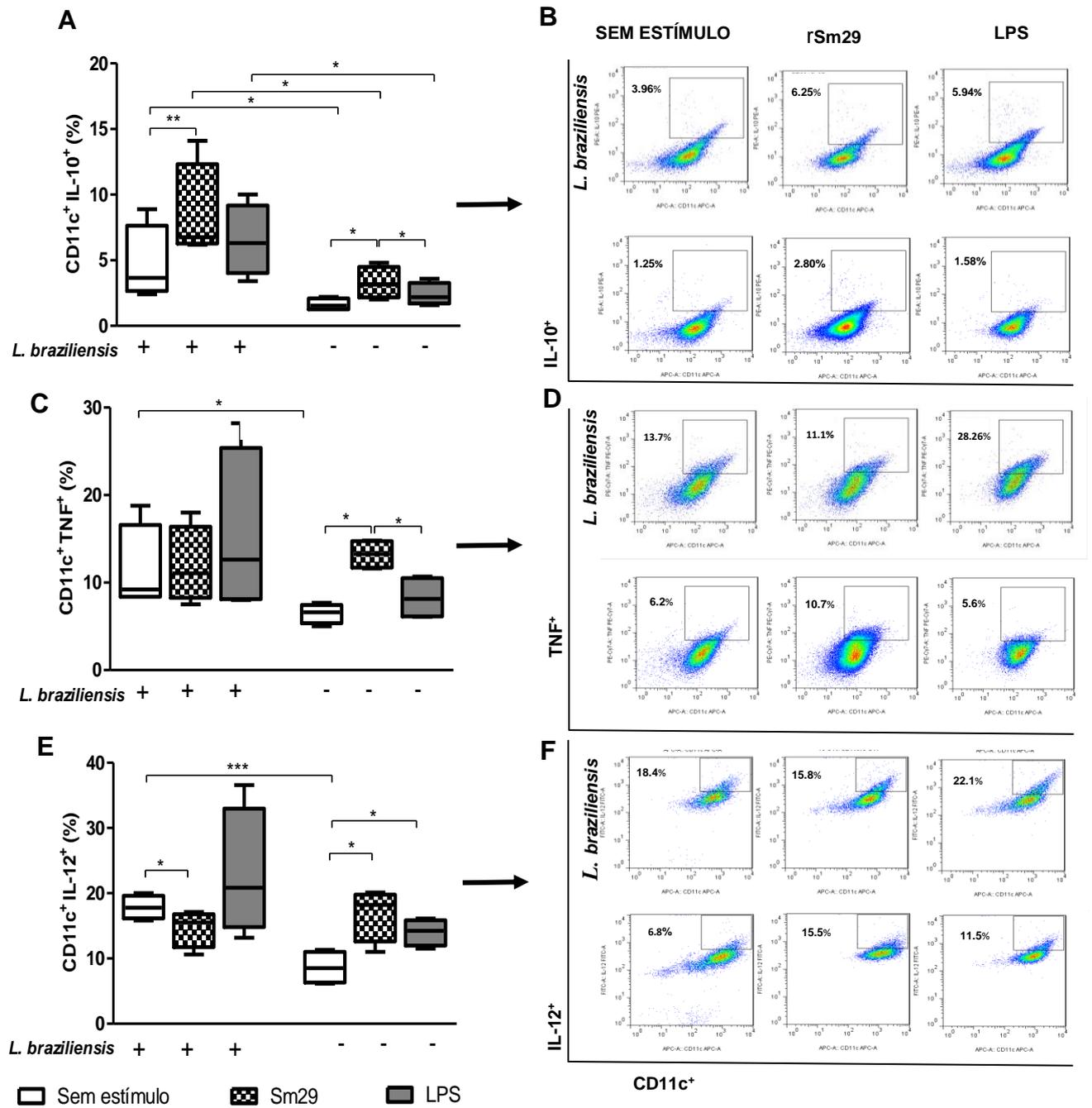


Figura 4. Frequência de MoDCs expressando as citocinas intracelulares CD11c⁺IL-10 (A), CD11c⁺TNF (B) e CD11c⁺IL-12 (C) após 24h de co-culturas com linfócitos autólogos infectados ou não pela *L. braziliensis*, estimuladas pelo rSm29 (10µg/mL) ou LPS (100ng/mL). Os resultados são expressos como mediana, valores min. - max. e percentis. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,001. Teste de Friedman.

5.3.3 Efeito do bloqueio de IL-10 na expressão dos marcadores de superfície e citocinas intracelulares nas MoDCs co-cultivadas com linfócitos autólogos

Sabendo-se que um dos principais mecanismos de regulação da resposta imune induzida pelo antígeno rSm29 *in vitro* na leishmaniose foi mediado pelo aumento na frequência de células expressando IL-10 e na produção dessa citocina *in vitro* (BAFICA et al., 2012; LOPES et al., 2014), resolvemos avaliar o efeito do bloqueio desta citocina na frequência de MoDCs expressando moléculas de ativação, maturação, co-estimulatórias e de regulação. O bloqueio de IL-10 nas co-culturas de MoDCs infectadas pela *L. braziliensis* e estimuladas pelo rSm29, levou a um aumento na expressão de HLA-DR^{hi} [MIF: 163 (76-315)] e na frequência das MoDCs expressando CD1a [55% (49-58)] e CD80 [60% (49-70)] comparadas às culturas sem o bloqueio desta citocina (*p<0,05; Tabela 1). O bloqueio de IL-10 não alterou a frequência de células dendríticas expressando CD40, CD83, CD86 e IL-10R comparadas as culturas sem bloqueio (Tabela 1).

Tabela 1. Bloqueio de IL-10 (10ng/mL) nas culturas de células dendríticas derivadas de monócitos estimuladas com rSm29 (10µg/mL), infectadas pela *Leishmania braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos de pacientes com leishmaniose cutânea (n=4) por 24h. Teste T não pareado.

Moléculas	rSm29	rSm29+ α IL-10	p
CD11c ⁺ CD83 ⁺ (%)	41 (23-63)	48 (13-65)	ns
CD11c ⁺ HLA-DR ⁺ (MIF)	78 (21-159)	163 (76-315)	<0,05
CD11c ⁺ CD1a ⁺ (%)	27 (16-52)	55 (49-58)	<0,005
CD11c ⁺ CD80 ⁺ (%)	41 (23-64)	59 (49-69)	<0,05
CD11c ⁺ CD86 ⁺ (%)	92 (86-97)	81 (47-95)	ns
CD11c ⁺ CD40 ⁺ (%)	26 (12-75)	34 (24-35)	ns
CD11c ⁺ IL-10R ⁺ (%)	19 (6-34)	16 (5-39)	ns

5.3.4 Frequência de MoDCs expressando receptor de IL-10 após estímulo pelo rSm29 e co-cultivadas com linfócitos autólogos

Desde que a diminuição na frequência de expressão do receptor de IL-10 (IL-10R) *in situ* tem sido associada a um agravamento no processo inflamatório associado à lesão tegumentar (FARIA et al., 2005) e que estudo prévio pelo nosso grupo mostrou que o estímulo *in vitro* pelo rSm29 aumenta a frequência de CD11⁺IL-10R⁺ nas culturas estimuladas pelo antígeno solúvel de *L. braziliensis* decidimos avaliar se o rSm29 aumenta a frequência de CD11⁺IL-10R⁺ nas co-culturas de pacientes com leishmaniose infectadas pela *L. braziliensis*.

Observamos que a adição do rSm29 levou a uma aumento na frequência de MoDCs expressando IL-10R⁺ nas co-culturas infectadas pela *L. braziliensis* de pacientes com LC [19% (6-34)], comparadas às culturas não estimuladas [16% (7-25); $p < 0,05$. Figuras 5B]. O mesmo foi observado nas culturas não infectadas, onde a adição de rSm29 também aumentou a frequência de MoDCs expressando IL-10R [18% (3-43)] comparadas às culturas não estimuladas [IL-10R: 13% (1-23); $*p < 0,05$. Figuras 5A] ou às culturas estimuladas com LPS [IL-10R: 13% (2-23); $*p < 0,05$. Figura 5B].

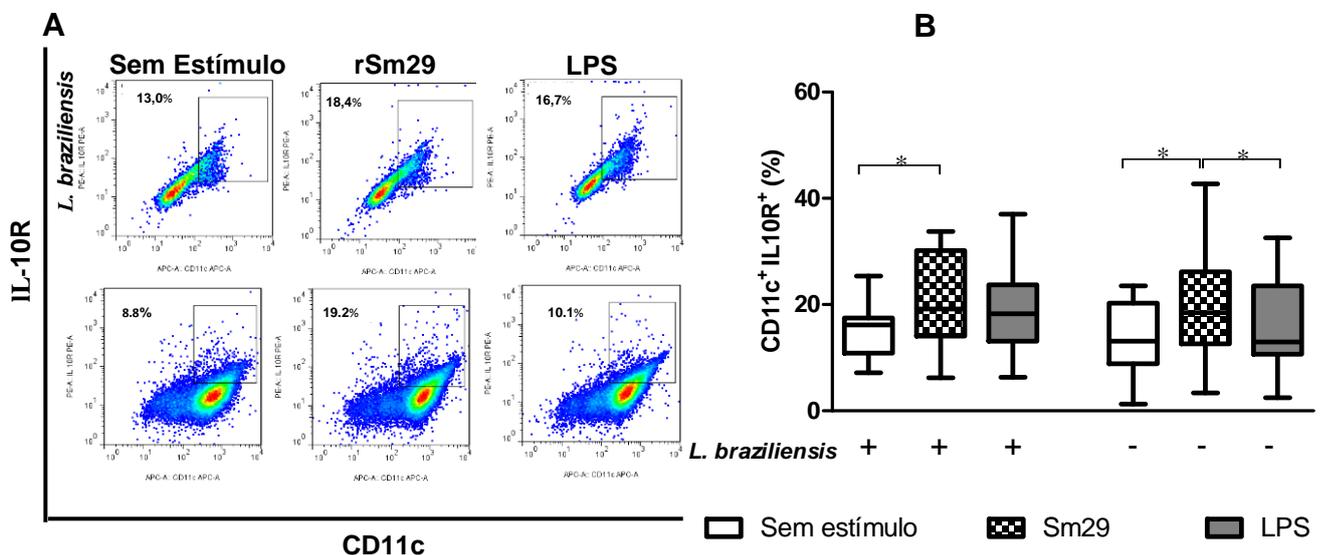


Figura 5. Frequência de MoDCs estimuladas pelo rSm29 (10 μ g/mL) ou LPS (100ng/mL) e infectadas ou não pela *L. braziliensis*, co-cultivadas com linfócitos autólogos por 24h expressando o receptor de IL10 (IL-10R). (A) Plot representativo de um experimento. (B) Frequência de CD11c⁺IL-10R⁺ em MoDCs. Os resultados são expressos como mediana, valores min. - max. e percentis. $*p < 0,05$. Teste de Friedman.

5.3.5 Avaliação fenotípica dos linfócitos T CD4⁺ nas co-culturas com MoDCs de indivíduos com LC após estímulo pelo rSm29

O perfil fenotípico das moléculas associadas à ativação/regulação nos linfócitos TCD4⁺ nas co-culturas de MoDCs infectadas ou não e linfócitos autólogos de pacientes com leishmaniose cutânea também foi avaliado.

A adição do antígeno rSm29, nas co-culturas de MoDCs infectadas + linfócitos, levou a uma diminuição na frequência de linfócitos T CD4⁺ [66% (19-85)] comparadas às culturas não estimuladas [62% (19-82); $p < 0,05$]. Nas culturas não infectadas não foi observado diferença estatística pela adição do rSm29 (Figura 6A). Em relação a molécula co-estimulatória associada a ativação celular, CD28, a adição do antígeno rSm29 levou a uma diminuição na frequência de linfócitos T CD4⁺CD28⁺ [35% (22-72)], comparadas às culturas não estimuladas [56% (17-77); $p < 0,05$]. Nas culturas não infectadas não foi observado diferença estatística pela adição do rSm29 (Figura 6A).

Em relação às moléculas associadas a regulação da resposta imune, CTLA-4 e CD25^{high} observou-se que a adição do rSm29 aumentou a frequência de linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺ [2,7% (1,3-7,0)] e T CD4⁺CD25^{high} [0,8% (0,2-4)] nas co-culturas de MoDCs infectadas + linfócitos, em relação as culturas não estimuladas [CTLA-4: 0,9% (0,1-2,6); CD25^{high}: 0,3% (0,1-2,6); $p < 0,05$, Figuras 6B e C, respectivamente]. A frequência de linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺ também foi maior nas culturas não infectadas [2,8% (0,9-5,1)] em relação às culturas sem estímulo [0,7% (0,1-2,5); $*p < 0,05$, figura 6B]. Nas culturas infectadas e estimuladas com rSm29 a frequência de linfócitos T CD4⁺CD25^{high} [0,8% (0,2-4)] foi maior quando comparado as culturas não infectadas [0,3% (0,1-0,7); $*p < 0,05$, figura 6B].

A adição de rSm29 não alterou a frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando a molécula co-estimulatória CD40L [3% (2,4-9,3)] e a frequência dos linfócitos T CD4⁺ expressando a molécula CD25^{low} [6% (2-16)], em relação as culturas não estimuladas [CD40L: 2% (1-7); CD25^{low}: 6% (3-14), respectivamente, Figuras 6A, D e E], tanto nas culturas infectadas pela *L. braziliensis* como nas culturas não infectadas.

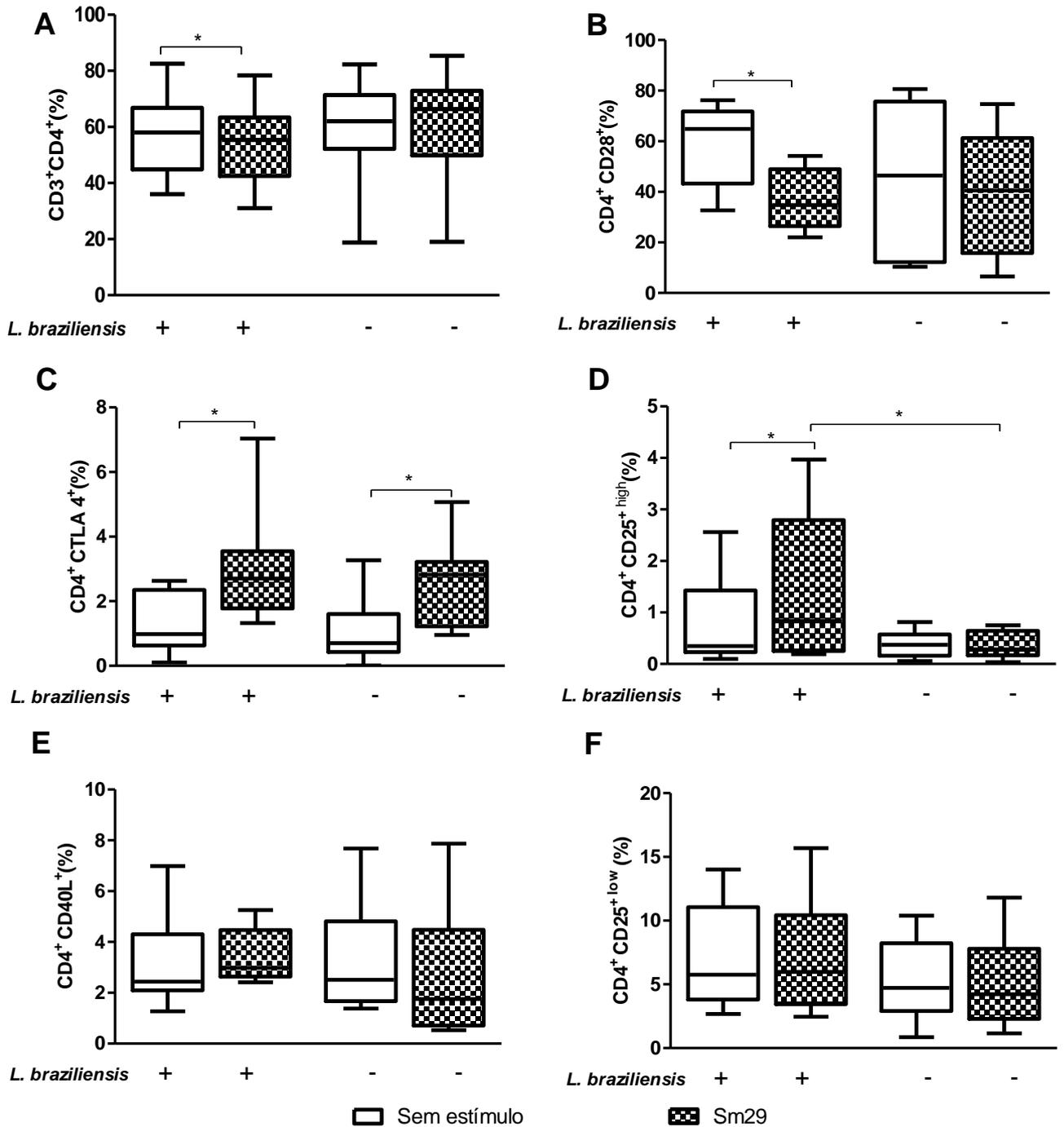


Figura 6. Frequência de linfócitos TCD4⁺ (A), T CD4⁺CD28 (B), T CD4⁺CTLA-4 (C), T CD4⁺CD25^{high} (D) T CD4⁺CD40L (E) e T CD4⁺CD25^{low} (F) nas co-culturas com MoDCs por 24h de indivíduos com LC após estímulo pelo rSm29. Os resultados foram expressos como mediana, valores min. - max. e percentis. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,001, teste T não pareado.

5.3.6 Avaliação fenotípica dos linfócitos TCD8⁺ nas co-culturas de MoDCs de indivíduos com LC após estímulo pelo rSm29

A adição do antígeno rSm29, nas co-culturas de MoDCs infectadas + linfócitos, levou a uma diminuição na frequência de linfócitos T CD8⁺ [15% (10-33)] comparadas às culturas não estimuladas [17% (11-36)]; $p < 0,05$, Figura 6A].

Em relação aos marcadores fenotípicos nos linfócitos TCD8⁺, semelhante ao observado para os linfócitos TCD4⁺, a adição de rSm29 às co-culturas infectadas pela *L. braziliensis* levou a uma redução na frequência de linfócitos TCD8⁺ expressando CD28 [23% (10-58)] e um aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺CTLA-4⁺ [9% (6-13)] e T CD8⁺CD25⁺ [10% (8-14)] em relação às culturas não estimuladas [CD28: 31% (15-61); CTLA-4: 6% (2-11); CD25: 7% (5-12); $p < 0,05$, Figuras 7B, C e D respectivamente]. A frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD40L foi semelhante entre as culturas estimuladas com rSm29 [12% (5-23)] e sem estímulo [9% (5-16), Figura 7E].

Nas co-culturas MoDCs + linfócitos não infectadas não foram observadas diferenças na frequência de linfócitos TCD8⁺ ou na expressão das moléculas CD28, CTLA-4, CD25 ou CD40L pr estas células em relação às co-culturas sem estímulos (Figuras 7A, B, C, D e E, respectivamente).

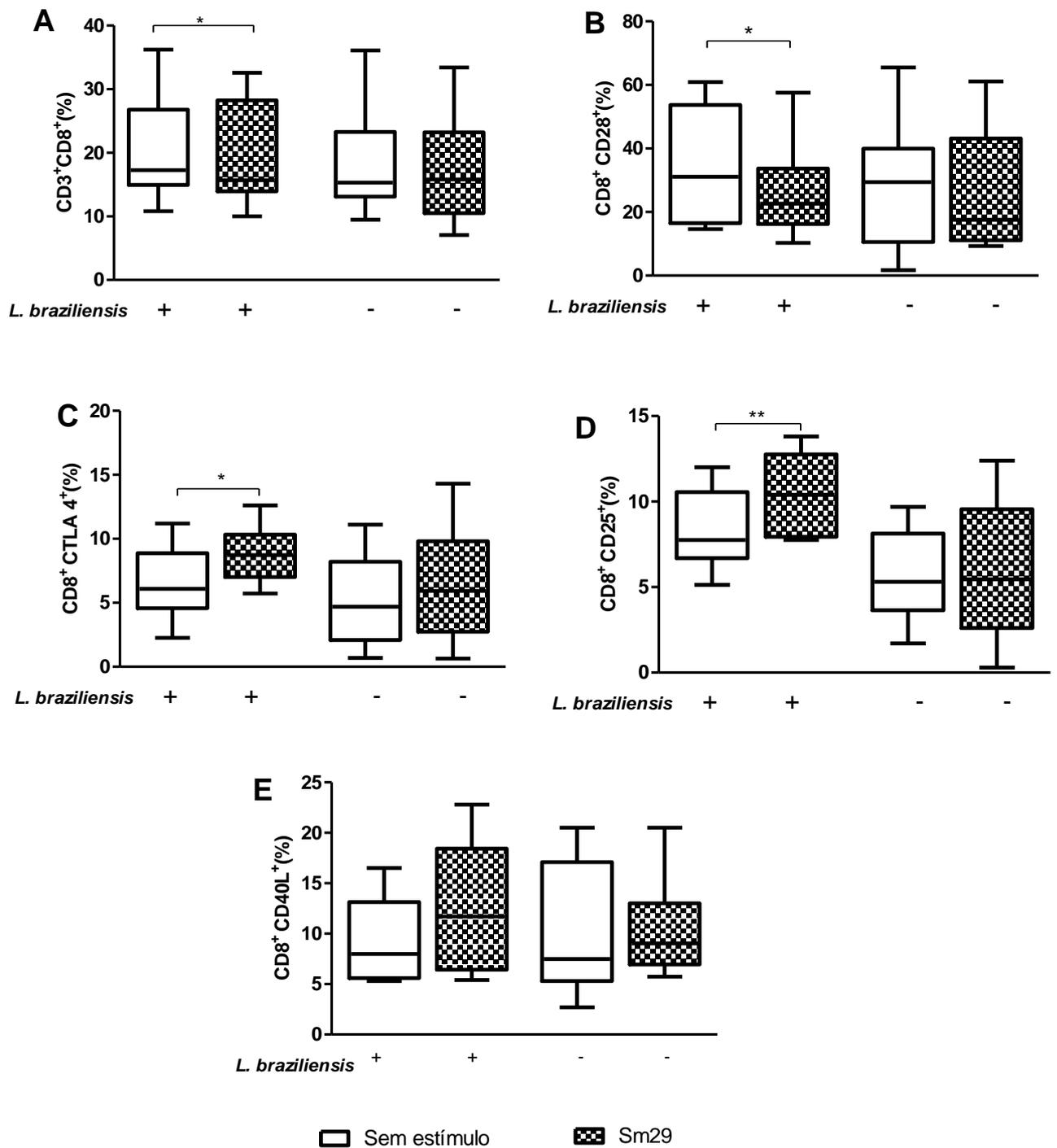


Figura 7. Frequência de linfócitos T CD8⁺ (A) após 24h de co-culturas com MoDCs infectadas ou não pela *L. braziliensis* estimuladas pelo rSm29 de indivíduos com LC. Expressão de T CD8⁺CD28 (B), T CD8⁺CTLA-4 (C), T CD8⁺CD25 (D) e T CD8⁺CD40L (E). Os resultados foram expressos como mediana, valores min. - max. e percentis. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$, teste T não pareado.

5.3.7 Níveis de citocinas no sobrenadante das co-culturas de MoDCs infectadas ou não infectadas pela *L. braziliensis*, com linfócitos autólogos

Avaliamos ainda os níveis de citocinas no sobrenadante das culturas de MoDCs infectadas ou não pela *L. braziliensis* + Linfócitos observamos no sobrenadante das culturas estimuladas com o antígeno rSm29 um aumento nos níveis de IL-10 (536 ± 527 pg/mL) em relação às culturas sem estímulo [$(171 \pm 134$ pg/mL); $p < 0,05$] ou estimuladas pelo LPS [$(202 \pm 253$ pg/mL) $p < 0,05$], figura 8A. Por outro lado, nessas culturas infectadas observou uma diminuição nos níveis de IL-12p40 (257 ± 124 pg/mL) e INF- γ (1044 ± 501 pg/mL) comparadas às culturas não estimuladas [IL-12p40: 1126 ± 1029 pg/mL; $p < 0,05$; INF- γ : 1810 ± 684 pg/mL]. Não houve alteração nos níveis de TNF pela adição de rSm29 às culturas infectadas pela *L. braziliensis* (Figura 8B). Nas culturas infectadas estimuladas com LPS apresentaram níveis mais baixos de IL-12p40 (376 ± 292 pg/mL) comparadas às culturas não estimuladas (IL-12p40: 1126 ± 1029 pg/mL; $p < 0,05$, Figura 8C).

Nas co-culturas não infectadas de MoDCs com linfócitos autólogos observamos que a adição de rSm29 foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 (913 ± 794 pg/mL), TNF (204 ± 203 pg/mL) e IL-12p40 (369 ± 248 pg/mL) em relação às culturas não estimuladas [IL-10: 499 ± 1054 pg/mL; TNF: 65 ± 78 pg/mL; IL-12p40: 100 ± 33 pg/mL; * $p < 0,05$, Figuras 8A, B e C] ou estimuladas com LPS [IL-10: 583 ± 487 pg/mL; TNF: 80 ± 86 pg/mL; * $p < 0,05$, Figuras 8A e B]. Ainda nestas culturas o estímulo com LPS levou a um aumento dos níveis de IL-12p40 (295 ± 270 pg/mL) comparadas às culturas não estimuladas (100 ± 33 pg/mL; $p < 0,05$, Figura 8C). Neste grupo, os níveis de INF- γ foram semelhantes entre as culturas estimuladas com rSm29 ($37,7 \pm 11,9$ pg/mL), estimuladas com LPS ($49,8 \pm 60,0$ pg/mL) e não estimuladas ($41,0 \pm 22,2$ pg/mL), figura 8D.

A infecção das MoDCs pela *L. braziliensis* nas culturas não estimuladas aumentou os níveis das citocinas TNF, IL-12p40 e INF- γ comparadas as culturas não infectadas (Figuras 8 B, C e D, respectivamente).

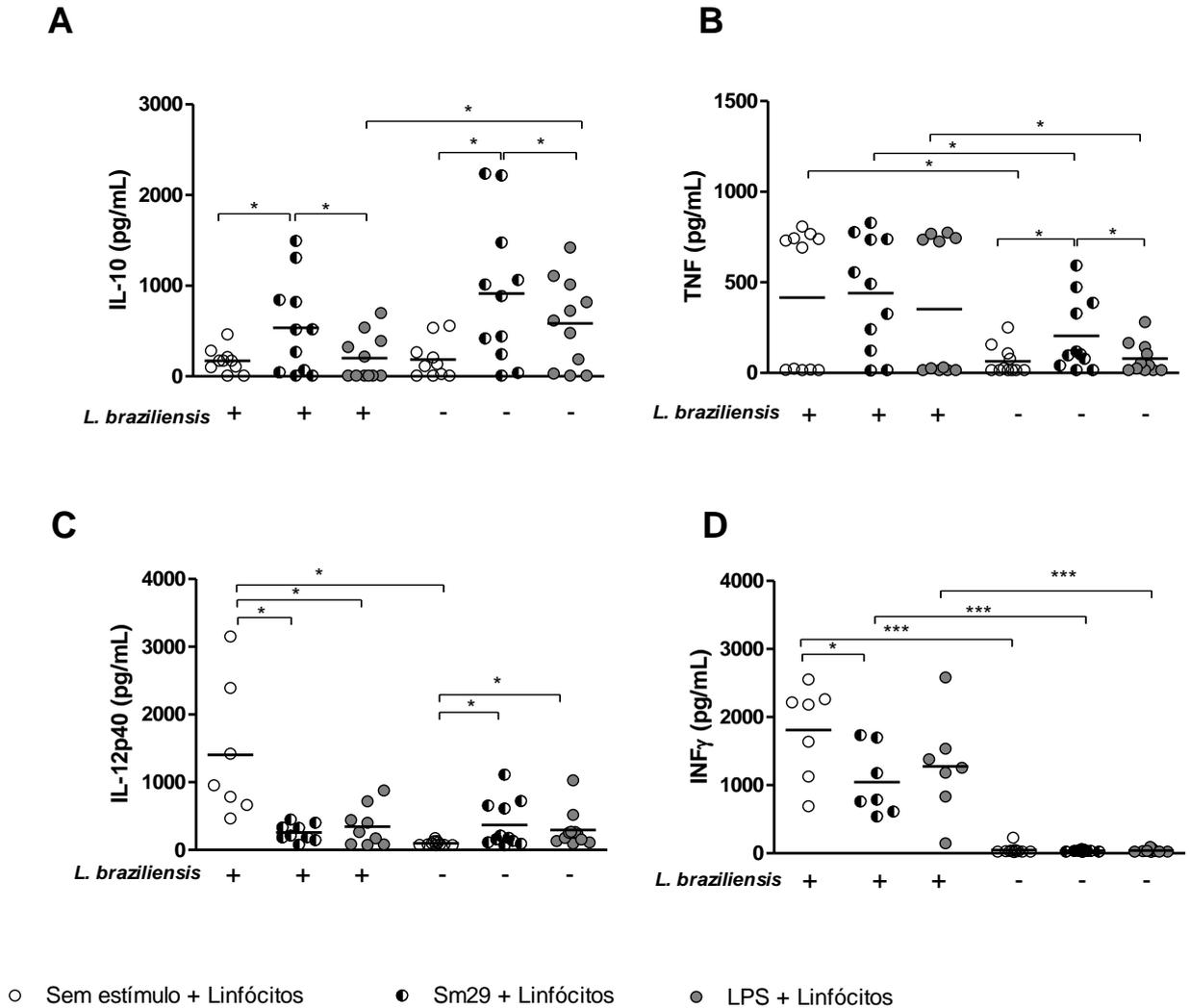


Figura 8. Níveis de IL-10 (A), TNF (B), IL-12p40 (C) e INF- γ (D) no sobrenadante das culturas de MoDCs estimuladas ou não pelo rSm29, infectadas e não infectadas pela *L. braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos por 24h. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$. Teste de Friedman.

5.3.8 Avaliação da infectividade das co-culturas de MoDCs após estímulo pelo rSm29

Finalmente, avaliamos o efeito da adição do antígeno rSm29 na infectividade das MoDCs pela *L. braziliensis*. Inicialmente realizamos uma cinética de infectividade nas MoDCs pelas *L. braziliensis* e não observamos diferenças na adição do rSm29 em relação as células não estimuladas nos tempos de 2h, 24h, 48h e 72h após a infecção avaliados por microscopia óptica (dados não mostrados). Na avaliação microscópica o estímulo com rSm29 não aumentou a frequência de MoDCs infectadas pela *L. braziliensis* [39% (26-54)], nem o número de amastigotas em 100 células [220 amastigotas (57-302)] comparadas as culturas não estimuladas [44% (39-50); 203 amastigotas (68-328)]; respectivamente, figura 9A].

Avaliando-se a frequência e MIF de CFSE como indicador da proliferação da *Leishmania* nas MoDCs (CD11c⁺) observamos que, assim como visto na microscopia óptica, a presença do antígeno de rSm29 não alterou a proliferação das leishmanias no interior da MoDCs [21% (13-71); MIF: 663 (222-1089)] em relação às culturas não estimuladas [29% (14-63; MIF: 721 (192-1172)]; Figura 9B]. Este dado pode ser comprovado pela figura 9C que mostram a frequência de divisão (FD) e o índice de proliferação (IP) destas células estimuladas pelo rSm29 [FD: 35% (23-100); IP: 2,3 (1,2-6,8)] ou não estimuladas [FD: 64% (30-92); IP: 2,0 (1,1-5,8)]; Figura 9C].

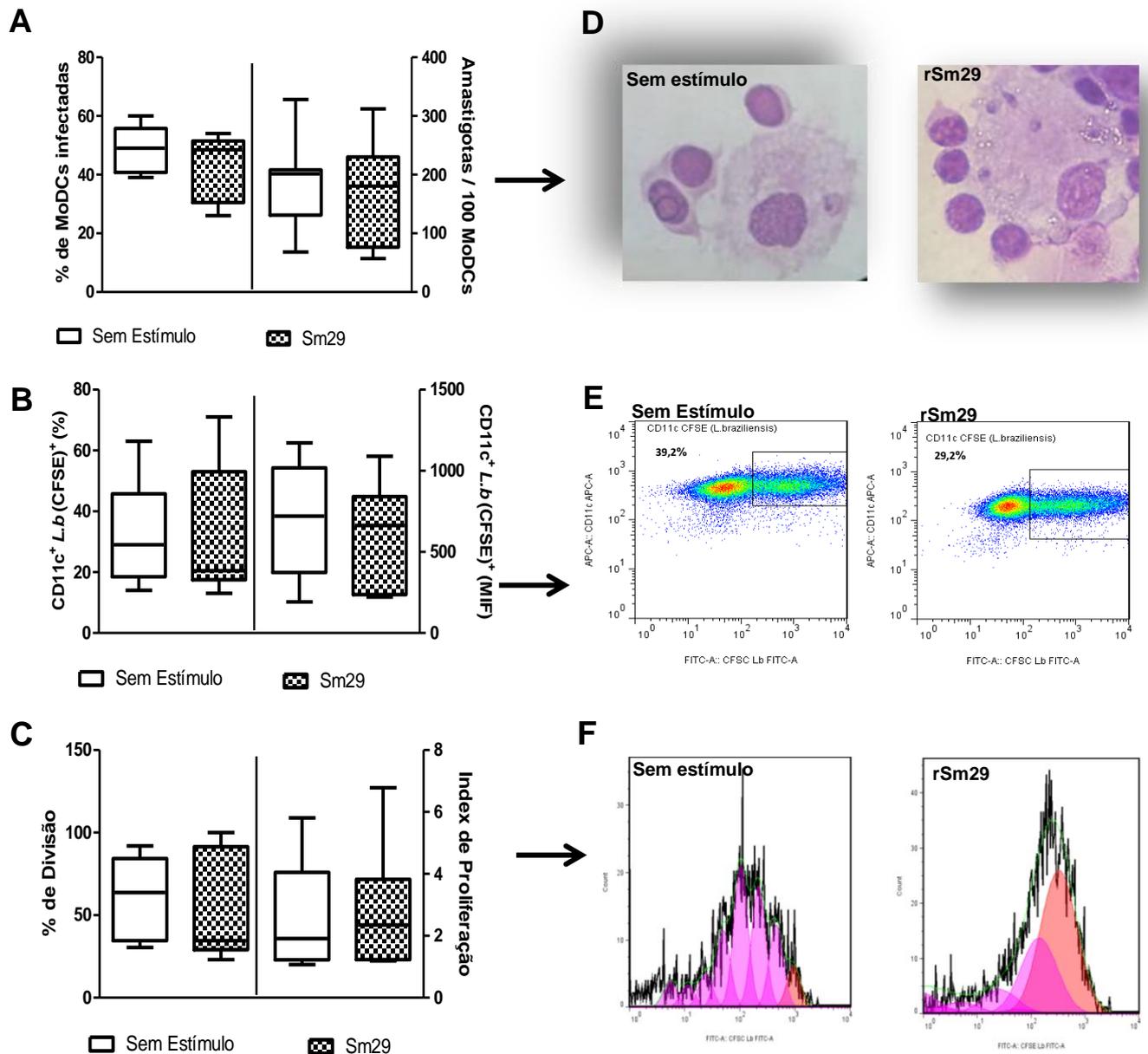


Figura 9. Infectividade por 2h das *L. braziliensis* nas MoDCs estimuladas pelo rSm29 (10µg/mL) e em seguida co-cultivadas com linfócitos autólogos por 24h. (A) Frequência de MoDCs infectadas e número de amastigotas/100 MoDCs, (B) Frequência de expressão de CFSE nas *L. braziliensis* e média de intensidade de fluorescência de CFSE ligado nas *L. braziliensis* nas MoDCs (CD11c⁺), (C) Frequência de divisão das formas amastigotas nas MoDCs e index de proliferação das formas amastigotas nas MoDCs, (D) Grafico representativo de um experimento avaliando a infectividade das MoDCs pela *L. brazisiensis*, (E) Dot representativo de um experimento avaliando a taxa de infecção pela *L. brazisiensis* (CFSE⁺) nas MoDCs (CD11c⁺), (F) Histograma representativo de um experimento avalindo proliferação das amastigotas através da expressão de CFSE em MoDCs (CD11c⁺). Os resultados são expressos como mediana, valores min. - max. e percentis.

5.4 DISCUSSÃO

O aparecimento da úlcera leishmaniótica como manifestação clínica mais importante na leishmaniose cutânea é decorrente da exacerbação da resposta imune predominantemente do tipo Th1/inflamatória. A produção de IFN- γ e TNF, ao tempo em que é importante para eliminação da *Leishmania*, devido a estimulação macrofágica, quando exacerbada está associada à lesão tecidual (BACELLAR *et al.*, 2002). Os eventos iniciais na infecção pela *Leishmania sp.*, envolvendo os macrófagos e as células dendríticas na produção de citocinas e na apresentação de antígenos do parasito para células T, podem influenciar a resposta do hospedeiro e o curso da infecção (DE SAINT-VIS *et al.*, 1998). Sendo assim, o ambiente celular associado ao perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é importante para controlar a multiplicação parasitária sem causar danos ao hospedeiro (BELKAID, 2003; CARVALHO *et al.*, 2005).

Nosso grupo tem realizado alguns estudos na tentativa de caracterizar antígenos do *S. mansoni* com propriedades regulatórias, que permitam modular o processo inflamatório exacerbado associado às doenças de base imunológica, a exemplo da asma (CARDOSO *et al.*, 2006; PACÍFICO *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010), da infecção pelo HTLV-1 (LIMA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2017) e da leishmaniose (BAFICA *et al.*, 2011; BAFICA *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2014). Sabe-se que este efeito modulador não depende do parasito vivo, haja visto que antígenos oriundos desses patógenos possuem essa mesma propriedade moduladora (VELUPILLAI *et al.*, 2000), contudo os mecanismos responsáveis para melhor esclarecer esse fenômeno estão sendo estudados. Alguns destes mecanismos incluem a indução da produção de células e moléculas regulatórias a exemplo de células T CD4⁺CD25⁺ e das moléculas CTLA-4 e IL-10 (ZACCONI *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010; BAFICA *et al.*, 2012).

O presente estudo avaliou a capacidade do antígeno rSm29 do *S. mansoni* em induzir o perfil regulatório tanto nas células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) como nos linfócitos e conseqüentemente regular a inflamação exacerbada observada na leishmaniose cutânea. A escolha do antígeno rSm29 decorreu de estudos prévios mostrando o potencial modulatório deste antígeno nas doenças que cursam com uma exacerbação da resposta imune, como revisado recentemente por Oliveira e cols. (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Adicionalmente, estudo prévio pelo nosso

grupo mostrou que a estimulação *in vitro* pelo antígeno rSm29 em PBMC de pacientes com leishmaniose foi capaz de aumentar a produção de IL-10 e reduzir IFN- γ em um número expressivo de indivíduos (BAFICA *et al.*, 2011). Nosso grupo mostrou ainda que MoDCs de indivíduos com leishmaniose, estimuladas com SLA+rSm29 apresentaram um perfil de ativação não convencional, ou seja, aumento na frequência de marcadores de ativação e moléculas co-estimulatórias, com paralelo aumento na frequência de expressão de IL-10 e do seu receptor (LOPES *et al.*, 2014). Dando continuidade ao estudo anterior, neste estudo decidimos avaliar o efeito da estimulação pelo rSm29 nas MoDCs de indivíduos com leishmaniose infectadas pela *L. braziliensis*, além de avaliarmos os marcadores fenotípicos nos linfócitos autólogos. Esta melhor caracterização nos ajudará a identificar estratégias terapêuticas no controle da resposta exacerbada induzida pela infecção por este parasito.

Pouco se sabe sobre a habilidade de antígenos de helmintos em induzirem a maturação de células dendríticas. Em nosso estudo observamos que o antígeno rSm29 induziu maturação, avaliada pela expressão de CD83, nas MoDCs infectadas pela *L. braziliensis*. Um estudo *in vitro* mostrou que a adição do antígeno excretório-secretório da *Taenia crassiceps* (TcES) às culturas de MoDCs de indivíduos saudáveis estimuladas pelo LPS levou a um aumento na expressão de CD83, porém a presença do TcES sozinho não alterou o estado de maturação destas células (TERRAZAS *et al.*, 2011). Neste estudo não adicionamos LPS as culturas estimuladas pelo rSm29, entretanto, nas culturas estimuladas apenas pelo LPS, observamos um aumento na maturação destas células em relação as culturas sem estímulo, tanto infectadas ou não. Em relação a infecção pela *Leishmania*, os estudos são divergentes, dependendo das diferentes espécies do parasito. Alguns estudos mostram que a interação de células dendríticas (DC) por diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo a *L. braziliensis*, limita o processo de ativação e maturação das DCs, levando a uma resposta imune menos efetora dos linfócitos T na eliminação parasitária (CARVALHO *et al.*, 2008; RESENDE *et al.*, 2013). Por outro lado, um estudo em modelo experimental, utilizando células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos infectadas pela *L. braziliensis* mostrou um aumento na sua maturação comparadas as células não infectadas, sendo estas células capazes de promover a ativação de linfócitos T (VARGAS-INCHAUSTEGUI

et al., 2008). Um estudo de Favali e cols. (2007) mostraram que a infecção *in vitro* de MoDCs de humanos pela *L. amazonensis* ou mesmo o estímulo pelo SLA não alteraram a capacidade de maturação destas células avaliadas pela expressão de CD83 (FAVALI *et al.*, 2007).

Em relação a expressão da molécula associada a apresentação antigênica, HLA-DR, observamos que a estimulação pelo rSm29 ou pelo LPS não alterou a média de intensidade de fluorescência desta molécula nas MoDCs infectadas ou não pela *L. braziliensis* em relação as culturas não estimuladas. Dados prévios do nosso grupo, mostram que estímulo com rSm29 em cultura de MoDCs de pacientes com LC apresentaram expressão de HLA-DR semelhantes às células não estimuladas (LOPES *et al.*, 2014). Por outro lado, monócitos de pacientes com LC estimuladas com rSm29 apresentaram menor expressão de HLA-DR comparado a células não estimuladas (BAFICA *et al.*, 2012).

Em modelo experimental de co-infecção helminto-protozoário, foram observados que células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) de camundongos co-infectados pelo *S. japonicum* e *Plasmodium berghei* apresentam menor expressão (MIF) de HLA-DR, comparadas as BMDCs de camundongos infectados apenas pelo *P. berghei* (WANG *et al.*, 2013). No nosso estudo a infecção apenas pela *L. braziliensis* não diferiu em relação a expressão desta molécula.

Avaliamos a influência do antígeno rSm29 na frequência de MoDCs expressando a molécula associada a apresentação de antígenos lipídicos, CD1a. Observamos que nas culturas infectadas pela *L. braziliensis* a estimulação pelo antígeno rSm29 levou a uma redução na frequência de MoDCs expressando CD1a. Tem sido demonstrado que a estimulação *in vitro* com antígenos derivados de helmintos, ou a própria infecção por helmintos são capazes de diminuir a expressão de CD1a em MoDCs tanto de indivíduos infectados pelos helmintos, como de controle sadios (RIGANO *et al.*, 2007; FUJIWARA *et al.*, 2009).

Um estudo realizado por Markikou-Ouni e cols. (2012) mostrou que infecção por *L. major* foi capaz de inibir a expressão de CD1a por células dendríticas (MARKIKOU-OUNI *et al.*, 2012). Outro estudo também mostrou que a infecção pela *L. donovani* também diminui a expressão de CD1a nas MoDCs e diminui a ativação de células T restritas a apresentação por CD1, sugerindo que pode representar uma estratégia de evasão do parasito, evitando o reconhecimento de glicolipídeos parasitários

(AMPREY *et al.*, 2004). No nosso estudo não observamos efeito da infecção na expressão de CD1a.

Estudo realizado por Favali e cols. mostrou que MoDCs de controles saudáveis infectadas pela *L. amazonensis* apresentaram uma menor frequência de CD1a e uma redução na capacidade de apresentação antigênica às células T quando co-cultivadas com linfócitos quando comparadas as culturas não infectadas (FAVALI *et al.*, 2007). Sendo assim, a diminuição na expressão desta molécula observada pela estimulação com rSm29 nas MoDCs infectadas pela *L. braziliensis* poderia interferir na habilidade de reconhecimento de antígenos lipídicos, porém não podemos inferir se essa redução na apresentação antigênica às células T prejudique a regulação da resposta imune.

Sabemos que a co-estimulação antigênica é essencial para a indução de uma resposta imune completa. O estado de ativação junto a expressão de moléculas co-estimulatórias das células dendríticas é importante para estimular os linfócitos T a montarem uma resposta imune efetora. No nosso estudo, observamos que a estimulação pelo rSm29 levou a um aumento na frequência de células CD11c⁺ expressando tanto CD80, como CD86, em relação às culturas não estimuladas, infectadas ou não pela *L. braziliensis*.

Diferentes patógenos podem influenciar de maneira distinta a maturação e ativação das células dendríticas e assim afetarem o desfecho da infecção (STEINMAN *et al.*, 2003; TERRAZAS *et al.*, 2011). Adicionalmente, diferentes antígenos derivados de helmintos atuam de forma também distinta na co-estimulação antigênica. Um estudo avaliando DCs derivadas da medula óssea de camundongos estimuladas com uma molécula derivada do *A. lumbricoides* (ABF), não observou um aumento na expressão das moléculas MHC classe II, CD80 e CD86 (DOWLING *et al.*, 2011).

Estudo avaliando a influência do *S. japonicum* na co-infecção pelo *Plasmodium berghei* observou que BMDCs de camundongos co-infectados apresentaram menor frequência de CD86 comparadas as BMDCs de camundongos infectados apenas pelo *P. berghei* (WANG *et al.*, 2013). Em estudos realizados com modelo experimental avaliando a infecção de DCs pela *Leishmania sp.* foi observado um aumento da frequência de células dendríticas infectadas expressando a molécula co-estimulatória CD86 (MAROVICH *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2008). Por outro lado, em MoDCs de indivíduos saudáveis foi demonstrado que tanto a presença da

infecção pela *L. amazonensis* ou a estimulação com SLA não alteram a expressão das moléculas CD80 e CD86 em relação as DCs não cultivadas com o parasito ou estimuladas com SLA (FAVALI *et al.*, 2007). As controvérsias observadas na literatura poderiam estar associadas ao modelo do estudo, a espécie da *Leishmania* e de helmintos e ao tipo de célula dendrítica estudado.

A interação das moléculas co-estimulatórias CD40/CD40L (CD154) presente nas células dendríticas e nos linfócitos, respectivamente, é importante para a indução de uma resposta imune efetora (CAUX *et al.*, 1994; MACDONALD *et al.*, 2002). A interação de CD40 nas células dendríticas humanas infectadas pela *L. major* com CD40L nos linfócitos fornece sinal para a ativação celular e produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-12 que induz um perfil Th1 (MAROVICH *et al.*, 2000).

A infecção *in vitro* de MoDCs de controles saudáveis pela *Leishmania major* aumentou a expressão de CD40, e sua interação com CD40L nos linfócitos aumentou a produção de IL-12p70 (MAROVICH *et al.*, 2000). Estudo com BMDCs de camundongos infectados pelo *S. mansoni* e estimuladas com antígeno do tegumento do esquistossômulo (Smteg) mostraram um aumento na frequência de CD40 comparadas as células de camundongos não infectados (DURAES *et al.*, 2009).

Estudo realizado anteriormente estimulando MoDCs de pacientes com LC com o antígeno rSm29 não observou diferença na expressão de CD40 comparado as células não estimuladas ou estimuladas com SLA (LOPES *et al.*, 2014). Em nosso estudo o antígeno rSm29 não aumentou a frequência de MoDCs infectadas pela *L. braziliensis* expressando CD40, este fato poderá ser o responsável pela não indução das citocinas pró-inflamatórias, IL-12 e TNF, observadas no estudo. Por outro lado, nas culturas não infectadas, onde se observou um aumento na frequência de células CD11c⁺CD40⁺ após estimulação pelo rSm29, observou-se também aumento na frequência das células expressando as citocinas IL-12p40 e TNF estimuladas por este antígeno.

A maioria dos marcadores associados à maturação, apresentação antigênica e co-estimulação avaliados neste estudo diferiu após a estimulação pelo rSm29, sugerindo ser o efeito atribuído ao antígeno do *S. mansoni* e não, a infecção pela *L. braziliensis*.

O padrão de citocinas produzidas no curso da leishmaniose também é fundamental para o desfecho clínico dessa doença. Ao avaliarmos a expressão intracelular das citocinas nas MoDCs observamos nas culturas infectadas, que a adição de rSm29 levou a uma diminuição na frequência de células expressando IL-12 e aumento na frequência destas células expressando IL-10. Nestas culturas não houve alteração na expressão de TNF pela adição do antígeno rSm29. Semelhante ao observado na expressão intracelular de citocinas nas MoDCs, no sobrenadante das co-culturas de MoDCs e linfócitos infectadas pela *L. braziliensis*, a estimulação pelo rSm29 levou a um aumento na produção da citocina regulatória IL-10 e uma diminuição na produção das citocinas IL-12p40 e INF- γ , sem alterar os níveis de TNF. Embora TNF e INF- γ sejam importantes para ativação de macrófagos infectados e eliminação intracelular parasitária, quando exacerbadas estão associadas com o aumento da inflamação e geração de dano tecidual na leishmaniose cutânea (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; AMEEN *et al.*, 2010). A estimulação pelo rSm29 neste estudo teve o objetivo de reduzir o processo inflamatório exacerbado, sem prejudicar os mecanismos efetores necessários a destruição da *Leishmania*. Desse modo, a manutenção dos níveis desta citocina foi um achado interessante do estudo.

Semelhantes aos dados observados em nosso estudo, Terraz e cols. em 2010 mostrou que DCs estimuladas com o antígeno TcES diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias e a proliferação de linfócitos, porém preserva a produção de IL-10 (TERRAZAS *et al.*, 2010). Em modelo experimental de camundongos co-infectados com *Schistosoma japonicum* e *Plasmodium sp* também apresentam níveis significativamente mais baixos de INF- γ em sobrenadantes de esplenócitos em comparação com animais mono-infectados. (SU *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2013).

Por outro lado, em estudo avaliando o antígeno rSm29 em modelo experimental mostrou que camundongos imunizados com rSm29 apresentaram um aumento na produção de IL-12 em relação aos animais não imunizados com este antígeno (CARDOSO *et al.*, 2008). A imunização com rSm29 de camundongos, e em seguida a infecção desses animais pelo *S. mansoni* induziu uma produção significativa de IL-2, INF- γ , IL-17, IL-4 e uma frequência aumentada de células de memória central T CD4 em comparação com grupo controle tratado com salina (ALVES *et al.*, 2015). Quimeras com rSm29 também estão sendo estudadas. A vacinação de camundongos com os antígenos SmtSP-2 com a porção N- ou C-terminal do rSm29

elevou os níveis de IFN- γ e TNF sem elevar IL-4 nos animais infectados com *Schistosoma mansoni* (PINHEIRO *et al.*, 2014). Desse modo, dependendo do modelo da doença e do tipo do estudo, os antígenos podem induzir resposta distinta.

Nas culturas não infectadas, houve um aumento na frequência de MoDCs expressando tanto IL-12p40, TNF como também IL-10, após estímulo pelo rSm29. Uma provável explicação para este resultado seria a indução de IL-10 nas culturas infectadas significativamente superior as culturas não infectadas, e desse modo, esta citocina tenha conseguido modular a produção de IL-12p40 apenas nestas culturas.

Tem sido demonstrado, não apenas na leishmaniose, mas em outros modelos de doença, tanto Th1 como Th2 (CARDOSO *et al.*, 2010; BAFICA *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2014) que a estimulação *in vitro* e em modelo experimental pelo antígeno rSm29 induz a produção e expressão de IL-10. Este, foi inclusive o racional para a escolha deste antígeno. A IL-10 é uma importante citocina com atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras (ARAUJO *et al.*, 2004). Em particular na célula dendríticas, a IL-10 tem sido associada a uma modulação na ativação e da capacidade de iniciação da resposta Th1 (CORINTI *et al.*, 2001).

Desde que a IL-10 tem sido associada a uma regulação na expressão de HLA-DR e moléculas co-estimulatórias (KIM *et al.*, 2011), avaliamos o efeito do bloqueio desta citocina *in vitro* na expressão das moléculas de superfície nas MoDCs infectadas e estimuladas pelo rSm29. Nossos resultados mostram que o bloqueio de IL-10 com anticorpo neutralizante anti-IL-10 restaurou a expressão de HLA-DR, CD1a e CD80, comparadas as culturas sem bloqueio. A ativação de DC isoladas do baço de camundongos deficientes de IL-10 foram comparadas às mesmas células de animais infectados com *Schistosoma mansoni* e observou que nesses animais deficientes havia um aumento da expressão de HLA-DR, CD80, CD86 e CD40, sugerindo que a maturação e ativação das DCs estava sendo regulada pela produção de IL-10 (MCKEE E PEARCE, 2004). A IL-10 induzida pelo rSm29 pode estar limitando a expressão de algumas moléculas de ativação e co-estimulatórias nas MoDCs e esta ativação não convencional das MoDCs pode favorecer o equilíbrio entre uma resposta efetora contra *Leishmania* e regulatória contra a exacerbação dessa resposta imune.

Nosso estudo mostrou que a frequência de células expressando o receptor da citocina IL-10 está aumentado nas co-culturas estimuladas com rSm29, tanto nas MoDCs infectadas ou não pela *L. braziliensis*. Previamente havíamos demonstrado que MoDCs de indivíduos com LC estimuladas com rSm29 e SLA aumenta a expressão de IL-10R comparadas as células não estimuladas, estimuladas apenas com SLA ou rSm29 (LOPES *et al.*, 2014). Um estudo publicado por Faria e cols. (2005) mostrou que a deficiência de expressão do receptor de IL-10 *in situ* na lesão estaria associada à resposta exacerbada observada na leishmaniose mucosa, quando comparada a LC (FARIA *et al.*, 2005). Outros estudos avaliando a expressão do receptor de IL-10 na leishmaniose referem-se na sua maioria a modelos experimentais de infecção, outras espécies de leishmanias e formas clínicas da doença (BELKAID *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2002; MURRAY *et al.*, 2003). Estudo com bloqueio do eixo IL-10, IL-10R em BMDCs mostrou que essas células se tornam mais ativadas e com maior expressão de HLA-DR, CD40 e de IL-12 quando estimuladas com LPS (KIM *et al.*, 2011). O aumento de IL-10R nas MoDCs pode contribuir para uma regulação dessas células e conseqüentemente menor ativação da resposta inflamatória responsável pelas lesões tegumentares na leishmaniose.

Avaliamos ainda neste estudo se a estimulação pelo rSm29 altera o perfil fenotípico dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ nas co-culturas de MoDCs de pacientes com LC infectadas ou não pela *L. braziliensis*.

Apenas nas co-culturas estimuladas pelo rSm29 de MoDCs infectadas observamos uma diminuição na frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em relação às culturas não estimuladas. Esta diferença não foi observada nas culturas não infectadas. Estudo de Wang e cols. (2013) mostrou que células dendríticas CD11c⁺ (DC) esplênicas de camundongos co-infectados com *Schistosoma japonicum* e *Plasmodium berghei* induzem menos proliferação de células T CD4 e produção de IFN- γ comparados a DCs de animais infectados apenas pelo *Plasmodium* (WANG *et al.*, 2013). Outro estudo mostrou que a proliferação de linfócitos T CD4 estava diminuída em camundongos co-infectados pelo nematódeo *H. polygyrus* e pelo *Plasmodium berghei* (SU *et al.*, 2005). Neste estudo não avaliamos proliferação celular, mas a alta produção de IL-10 observada na estimulação com o antígeno rSm29, nas culturas infectadas pela *L. braziliensis* poderia estar associada a diminuição na frequência dos linfócitos TCD4 e TCD8.

Observamos nas culturas estimuladas com o rSm29 uma diminuição na frequência de linfócitos T CD4 e T CD8 expressando CD28, ao tempo em que observamos um aumento na frequência destes linfócitos expressando as moléculas associadas a regulação celular, CTLA-4 e CD25. Na infecção pelo *Schistosoma* as células Treg (TCD4⁺CD25⁺) naturais e, em menor grau, as células Th2 desempenham papéis na supressão das respostas Th1 durante a esquistossomose (MCKEE E PEARCE, 2004). BMDCs de camundongos co-infectados pelo *S. japonicum* e *Plasmodium berghei* apresentam maior frequência de linfócitos Tregs comparadas as BMDCs de camundongos infectados apenas pelo *Plasmodium* (WANG *et al.*, 2013). A adição de DC pulsadas com antígeno de *Schistosoma* rSj22.6 foi capaz de aumentar a frequência de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ em camundongos imunizados com este antígeno (SHI *et al.*, 2010). BMDC estimuladas com antígeno de *Schistosoma japonicum* (Sj16) demonstraram um fenótipo imaturo e induziu um aumento na diferenciação de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺foxp3 e aumento na produção de IL-10 (SUN *et al.*, 2012). Estudos do nosso grupo avaliando antígenos de *Schistosoma mansoni* vêm mostrando a capacidade desses antígenos, dentre eles o rSm29 em induzir moléculas regulatórias nos linfócitos T (OLIVEIRA *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010; BAFICA *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2013). Este poderia ser um dos mecanismos pelos quais observamos no presente estudo uma diminuição da produção de INF- γ e aumento de IL-10 nos sobrenadantes das culturas estimuladas com o rSm29.

Diferentes estudos mostram a importância do balanço entre as células T CD4⁺ e CD8⁺, nas quais as primeiras teriam sua proporção reduzida durante o processo de cicatrização da lesão na LC, com aumento da população de T CD8⁺ (DA-CRUZ *et al.*, 2002). Este aumento na frequência de células T CD8⁺ após o tratamento, sugere que esta população celular estaria associada ao processo de cicatrização da lesão (DA-CRUZ *et al.*, 1994; DA-CRUZ *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2011).

As células T CD8⁺ participam na resposta imune contra *Leishmania* por diversos mecanismos, dentre eles a atividade citolítica nos macrófagos infectados. Esta capacidade citolítica das células T CD8, ao tempo em que seria importante para o controle das células parasitadas, estudos em modelo experimental mostraram relação entre estas células e o desenvolvimento de lesões metastáticas na leishmaniose cutânea (NOVAIS *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2013). Por outro lado,

estudo publicado por Cardoso e cols. mostrou que as células T CD8 estão em maior frequência e com maior atividade citotóxica nos indivíduos com LC em relação a indivíduos que não desenvolvem a lesão (subclínicos) (CARDOSO *et al.*, 2015). A diminuição na frequência de linfócitos T CD8 e aumento nos marcadores associados a regulação por estes linfócitos nas co-culturas estimuladas pelo rSm29 poderia favorecer uma menor citotoxicidade celular no hospedeiro com conseqüente redução na resposta inflamatória local.

Nosso estudo observou que o antígeno rSm29 não aumentou a infectividade da *L. braziliensis* nas MoDCs tanto pela frequência de células infectadas, como pelo número de amastigotas internalizados. Alguns estudos indicam que a co-infecção pelo *S. hematobium* promove alguma proteção contra a malária pelo *Plasmodium falciparum*, devido a baixa parasitemia em crianças avaliadas (BRIAND *et al.*, 2005; LYKE *et al.*, 2005; LEMAITRE *et al.*, 2014). Divergindo do estudo anterior, células sanguíneas de camundongos co-infectados pelo *S. japonicum* e *Plasmodium berghei* apresentam maior parasitemia do que as de camundongos infectados apenas pelo *Plasmodium* (WANG *et al.*, 2013). Porém esses camundongos co-infectados sobrevivem mais tempo e apresentam melhor escore clínico do que os mono-infectados pelo *Plasmodium* (WANG *et al.*, 2013). A infecção pré-existente pelo *S. japonicum* suprimiu a maturação de DC e teve um efeito anti-inflamatório durante a infecção pelo protozoário, não só em virtude da sua capacidade para induzir uma resposta Th2, mas também pela supressão direta da capacidade das DCs produzirem mediadores pró-inflamatórios (WANG *et al.*, 2013).

Na avaliação por citometria de fluxo das *Leishmanias braziliensis* marcadas com CFSE não apresentou diferença na frequência e MIF de CFSE nas MoDCs (CD11c⁺), pela presença do antígeno rSm29. Estes resultados sugerem que a proliferação das amastigotas no interior das MoDCs não foi influenciada por este antígeno. Portanto, a não proliferação deste parasito nas MoDCs estimuladas pelo rSm29 foi um achado importante, sugerindo um controle na resposta imune exacerbada principalmente pela indução de IL-10, e redução de IL-12, sem uma desativação desta resposta efetora, a qual poderia levar a uma provável disseminação parasitária. Adicionalmente os macrófagos são as células efetoras responsáveis pela destruição intracelular do parasito e, neste contexto o TNF tem um papel fundamental. A manutenção desta citocina inflamatória nas culturas

estimuladas pelo rSm29 poderá auxiliar nessa atividade efetora macrofágica sem, no entanto, favorecer a exacerbação desta resposta imune. Este é o perfil de resposta semelhante ao observado nos indivíduos subclínicos e desejável no controle da doença.

Considerando que existem poucas opções terapêuticas para leishmaniose tegumentar e que ultimamente os casos de refratariedade ao tratamento convencional tem aumentado (COELHO JÚNIOR *et al.*, 2016; PEREZ-FRANCO *et al.*, 2016) a utilização do rSm29 pode ser uma alternativa para o tratamento combinado, podendo ser uma estratégia importante para diminuir o tempo de cura das lesões em pacientes com LC causadas pela *L. braziliensis*.

5.5 CONCLUSÃO

O antígeno rSm29 foi capaz de aumentar *in vitro* a expressão de marcadores de ativação nas MoDCs e a expressão de moléculas associadas a regulação nos linfócitos T CD4+ e CD8+, além dos níveis de IL-10 no sobrenadante das co-culturas, sem aumentar a infectividade das MoDCs favorecendo uma resposta imune equilibrada, desejável no controle do processo inflamatório exacerbado associado a leishmaniose cutânea.

CONFLITOS DE INTERESSES

Os participantes desse referido estudo não apresentaram conflitos de interesses.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos pacientes de Corte de Pedra por participarem do estudo. A todas as equipes de profissionais que atuam nessa área endêmica por sua dedicação nos trabalhos clínicos do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIORGRÁFICAS

- Almeida, R., A. D'Oliveira, Jr., *et al.* Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous Leishmaniasis. J Infect Dis, v.180, n.5, Nov, p.1735-7. 1999.
- Alves, C. C., N. Araujo, *et al.* Sm29, but not Sm22.6 retains its ability to induce a protective immune response in mice previously exposed to a *Schistosoma mansoni* infection. PLoS Negl Trop Dis, v.9, n.2, Feb, p.e0003537. 2015.
- Ameen, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. Clin Exp Dermatol, v.35, n.7, Oct, p.699-705. 2010.
- Amprey, J. L., G. F. Spath, *et al.* Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with *Leishmania donovani*. Infect Immun, v.72, n.1, Jan, p.589-92. 2004.
- Araujo, M. I., B. S. Hoppe, *et al.* *Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.99, n.5 Suppl 1, p.27-32. 2004.
- Atochina, O. e D. Harn. Prevention of psoriasis-like lesions development in fsn/fsn mice by helminth glycans. Exp Dermatol, v.15, n.6, Jun, p.461-8. 2006.
- Bacellar, O., H. Lessa, *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. Infect Immun, v.70, n.12, p.6734-40. 2002.
- Badaro, R., T. C. Jones, *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infect Dis, v.154, n.6, p.1003-11. 1986.
- Bafica, A. M., L. S. Cardoso, *et al.* Changes in T-Cell and Monocyte Phenotypes In Vitro by *Schistosoma mansoni* Antigens in Cutaneous Leishmaniasis Patients. J Parasitol Res, v.2012, p.520308. 2012.
- _____. *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response in vitro during cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.106, n.7, Nov, p.856-63. 2011.
- Baratta-Masini, A., A. Teixeira-Carvalho, *et al.* Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. Front Biosci, v.12, Jan 01, p.839-49. 2007.
- Belkaid, Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. Expert Opin Biol Ther, v.3, n.6, Sep, p.875-85. 2003.
- Belkaid, Y., K. F. Hoffmann, *et al.* The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J Exp Med, v.194, n.10, Nov 19, p.1497-506. 2001.
- Bittencourt, A. L. e A. Barral. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.86, n.1, Jan-Mar, p.51-6. 1991.

Bourreau, E., C. Ronet, *et al.* Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. Infect Immun, v.77, n.4, Apr, p.1465-74. 2009.

Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. 2017. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>. Acessado em 17.01.2017.

Briand, V., L. Watier, *et al.* Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: protective effect of schistosomiasis on malaria in senegalese children? Am J Trop Med Hyg, v.72, n.6, Jun, p.702-7. 2005.

Cardoso, F. C., G. C. Macedo, *et al.* *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. PLoS Negl Trop Dis, v.2, n.10, Oct 01, p.e308. 2008.

Cardoso, L. S., S. C. Oliveira, *et al.* *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. Clin Exp Immunol, v.160, n.2, May, p.266-74. 2010.

_____. *Schistosoma mansoni* antigen-driven interleukin-10 production in infected asthmatic individuals. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.101 Suppl 1, Sep, p.339-43. 2006.

Cardoso, T. M., A. Machado, *et al.* Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. Infect Immun, v.83, n.3, Mar, p.898-906. 2015.

Carvalho, L. P., S. Passos, *et al.* Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. Scand J Immunol, v.61, n.4, Apr, p.337-42. 2005.

Carvalho, L. P., E. J. Pearce, *et al.* Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high levels of TNF-alpha, whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell responses. J Immunol, v.181, n.9, Nov 1, p.6473-80. 2008.

Caux, C., C. Massacrier, *et al.* Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J Exp Med, v.180, n.4, Oct 1, p.1263-72. 1994.

Celes, F. S., E. Trovatti, *et al.* DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. Sci Rep, v.6, Dec 06, p.38330. 2016.

Coelho Júnior, L. G., G. B. Machado, *et al.* American Cutaneous Leishmaniasis is refractory to medical treatment: case report. Rev Panam Infectol 2016.

Cooke, A., P. Tonks, *et al.* Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. Parasite Immunol, v.21, n.4, p.169-76. 1999.

Corinti, S., C. Albanesi, *et al.* Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. J Immunol, v.166, n.7, Apr 01, p.4312-8. 2001.

- Da-Cruz, A. M., Conceicao-Silva, F., *et al.* *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. Infect. Immun., v. 62, n.6, p.2614-8. 1994.
- Da-Cruz, A. M., R. Bittar, *et al.* T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. Clin Diagn Lab Immunol, v.9, n.2, Mar, p.251-6. 2002.
- Davies, C. R., E. A. Llanos-Cuentas, *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. Epidemiol Infect, v.114, n.2, Apr, p.297-318. 1995.
- De Saint-Vis, B., I. Fugier-Vivier, *et al.* The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. J Immunol, v.160, n.4, Feb 15, p.1666-76. 1998.
- Dowling, D. J., C. M. Noone, *et al.* *Ascaris lumbricoides* pseudocoelomic body fluid induces a partially activated dendritic cell phenotype with Th2 promoting ability in vivo. Int J Parasitol, v.41, n.2, Feb, p.255-61. 2011.
- Duraes, F. V., N. B. Carvalho, *et al.* IL-12 and TNF-alpha production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. Immunol Lett, v.125, n.1, Jun 30, p.72-7. 2009.
- Faria, D. R., K. J. Gollob, *et al.* Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. Infect Immun, v.73, n.12, Dec, p.7853-9. 2005.
- Favali, C., N. Tavares, *et al.* *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. J Leukoc Biol, v.82, n.6, Dec, p.1401-6. 2007.
- Fujiwara, R. T., G. G. Cancado, *et al.* *Necator americanus* infection: a possible cause of altered dendritic cell differentiation and eosinophil profile in chronically infected individuals. PLoS Negl Trop Dis, v.3, n.3, p.e399. 2009.
- Geiger, S. M., C. L. Massara, *et al.* Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. Clin Exp Immunol, v.136, n.2, May, p.334-40. 2004.
- Gollob, K. J., L. R. Antonelli, *et al.* Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. Int Immunopharmacol, v.8, n.10, Oct, p.1338-43. 2008.
- Jirmanus, L., M. J. Glesby, *et al.* Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. Am J Trop Med Hyg, v.86, n.3, Mar, p.426-33. 2012.

Kamau, S. W., R. Nunez, *et al.* Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. BMC Pharmacol, v.1, p.1. 2001.

Kim, J. H., T. H. Kang, *et al.* Blocking the immunosuppressive axis with small interfering RNA targeting interleukin (IL)-10 receptor enhances dendritic cell-based vaccine potency. Clin Exp Immunol, v.165, n.2, Aug, p.180-9. 2011.

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

Lemaitre, M., L. Watier, *et al.* Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: additional evidence of the protective effect of Schistosomiasis on malaria in Senegalese children. Am J Trop Med Hyg, v.90, n.2, Feb, p.329-34. 2014.

Leon, B., M. Lopez-Bravo, *et al.* Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. Immunity, v.26, n.4, Apr, p.519-31. 2007.

Lima, L. M., L. S. Cardoso, *et al.* *Schistosoma* antigens downregulate CXCL9 production by PBMC of HTLV-1-infected individuals. Acta Trop, v.167, Dec 28, p.157-162. 2017.

Lima, L. M., S. B. Santos, *et al.* *Schistosoma* antigens downmodulate the in vitro inflammatory response in individuals infected with human T cell lymphotropic virus type 1. Neuroimmunomodulation, v.20, n.4, p.233-8. 2013.

Lopes, D. M., J. S. Fernandes, *et al.* Dendritic cell profile induced by *Schistosoma mansoni* antigen in cutaneous leishmaniasis patients. Biomed Res Int, v.2014, p.743069. 2014.

Lyke, K. E., A. Dicko, *et al.* Association of *Schistosoma haematobium* infection with protection against acute *Plasmodium falciparum* malaria in Malian children. Am J Trop Med Hyg, v.73, n.6, Dec, p.1124-30. 2005.

Macdonald, A. S., A. D. Straw, *et al.* Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. J Immunol, v.168, n.2, Jan 15, p.537-40. 2002.

Markikou-Ouni, W., Y. Ben Achour-Chenik, *et al.* Effects of *Leishmania major* clones showing different levels of virulence on infectivity, differentiation and maturation of human dendritic cells. Clin Exp Immunol, v.169, n.3, Sep, p.273-80. 2012.

Marovich, M. A., M. A. McDowell, *et al.* IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. J Immunol, v.164, n.11, Jun 1, p.5858-65. 2000.

Mckee, A. S. e E. J. Pearce. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. J Immunol, v.173, n.2, Jul 15, p.1224-31. 2004.

Moraes, M. A. e F. T. Silveira. [Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.36, n.5, Sep-Oct, p.459-63. 1994.

Murray, H. W., C. M. Lu, *et al.* Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. Infect Immun, v.70, n.11, Nov, p.6284-93. 2002.

Murray, H. W., A. L. Moreira, *et al.* Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. J Infect Dis, v.188, n.3, Aug 1, p.458-64. 2003.

Ng, L. G., A. Hsu, *et al.* Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. PLoS Pathog, v.4, n.11, Nov, p.e1000222. 2008.

Novais, F. O., L. P. Carvalho, *et al.* Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. PLoS Pathog, v.9, n.7, p.e1003504. 2013.

Nylen, S. e S. Gautam. Immunological perspectives of leishmaniasis. J Glob Infect Dis, v.2, n.2, May, p.135-46. 2010.

Oliveira, R. R., K. J. Gollob, *et al.* *Schistosoma mansoni* infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. Microbes Infect, v.11, n.2, Feb, p.223-9. 2009.

Oliveira, S. C., B. C. Figueiredo, *et al.* A double edged sword: *Schistosoma mansoni* Sm29 regulates both Th1 and Th2 responses in inflammatory mucosal diseases. Mucosal Immunol, v.9, n.6, Nov, p.1366-1371. 2016.

Pacifico, L. G., F. A. Marinho, *et al.* *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells independent of interleukin-10. Infect Immun, v.77, n.1, Jan, p.98-107. 2009.

Perez-Franco, J. E., M. L. Cruz-Barrera, *et al.* Clinical and Parasitological Features of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis that Did Not Respond to Treatment with Meglumine Antimoniate. PLoS Negl Trop Dis, v.10, n.5, May, p.e0004739. 2016.

Pinheiro, C. S., A. P. Ribeiro, *et al.* A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. Parasite Immunol, v.36, n.7, Jul, p.303-12. 2014.

Resende, M., D. Moreira, *et al.* Leishmania-infected MHC class IIhigh dendritic cells polarize CD4⁺ T cells toward a nonprotective T-bet⁺ IFN-gamma⁺ IL-10⁺ phenotype. J Immunol, v.191, n.1, Jul 01, p.262-73. 2013.

reviewed Costa, J. M. L., A. C. R. Saldanha, *et al.* Clinical modalities, diagnosis and therapeutic approach of the tegumentary Leishmaniasis in Brazil. Gazeta Medica da Bahia, v.79 n.(Supl.3), p.10-83. 2009.

Moll, H. The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. Adv Exp Med Biol, v.479, p.163-73. 2000.

Scott, P. e F. O. Novais. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. Nat Rev Immunol, v.16, n.9, Sep, p.581-92. 2016.

Ribeiro-De-Jesus, A., R. P. Almeida, *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. Braz J Med Biol Res, v.31, n.1, p.143-8. 1998.

Rigano, R., B. Buttari, *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. Infect Immun, v.75, n.4, Apr, p.1667-78. 2007.

Roberts, C. B., J. A. Best, *et al.* Dendritic processing of excitatory synaptic input in hypothalamic gonadotropin releasing-hormone neurons. Endocrinology, v.147, n.3, Mar, p.1545-55. 2006.

Rosenbaum, A. L., D. L. Phelps, *et al.* Retinal hemorrhage in retinopathy of prematurity associated with tocopherol treatment. Ophthalmology, v.92, n.8, p.1012-4. 1985.

Sakthianandeswaren, A., J. M. Curtis, *et al.* Fine mapping of *Leishmania* major susceptibility Locus *Imr2* and evidence of a role for *Fli1* in disease and wound healing. Infect Immun, v.78, n.6, Jun, p.2734-44. 2010.

Santos Cda, S., V. Boaventura, *et al.* CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. J Invest Dermatol, v.133, n.6, Jun, p.1533-40. 2013.

Sewell, D. L., E. K. Reinke, *et al.* Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. Immunol Lett, v.82, n.1-2, Jun 3, p.101-10. 2002.

Steinman, R. M., D. Hawiger, *et al.* Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol, v.21, p.685-711. 2003.

Su, Z., M. Segura, *et al.* Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection. Infect Immun, v.73, n.6, Jun, p.3531-9. 2005.

Sun, X. J., R. Li, *et al.* Unique roles of *Schistosoma japonicum* protein Sjl6 to induce IFN- γ and IL-10 producing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in vitro and in vivo. Parasite Immunol, v.34, n.8-9, Aug-Sep, p.430-9. 2012.

Terrazas, C. A., L. Gomez-Garcia, *et al.* Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. Int J Parasitol, v.40, n.9, Aug 01, p.1051-62. 2010.

Terrazas, C. A., F. Sanchez-Munoz, *et al.* Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells. Int J Biol Sci, v.7, n.9, p.1391-400. 2011.

- Vargas-Inchaustegui, D. A., L. Xin, *et al.* *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. J Immunol, v.180, n.11, Jun 01, p.7537-45. 2008.
- Velupillai, P., E. A. Dos Reis, *et al.* Lewis(x)-containing oligosaccharide attenuates schistosome egg antigen-induced immune depression in human schistosomiasis. Hum Immunol, v.61, n.3, p.225-32. 2000.
- Wang, M. L., Y. M. Cao, *et al.* Pre-existing *Schistosoma japonicum* infection alters the immune response to Plasmodium berghei infection in C57BL/6 mice. Malar J, v.12, Sep 14, p.322. 2013.
- WHO. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis of WHO. 2017. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acessado em 17.01.2017.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, *et al.* Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. J Exp Med, v.198, n.2, Jul 21, p.235-47. 2003.
- Yang, X. O., A. D. Panopoulos, *et al.* STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. J Biol Chem, v.282, n.13, Mar 30, p.9358-63. 2007.
- Zaccone, P., Z. Fehervari, *et al.* *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. Eur J Immunol, v.33, n.5, May, p.1439-49. 2003.
- Zheng, X., X. Hu, *et al.* Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response. J Neuroimmunol, v.194, n.1-2, Feb, p.107-14. 2008.

6 CAPÍTULO 2: Manuscrito 2: Susceptibilidade de células dendríticas de indivíduos com esquistossomose à infecção pela *Leishmania braziliensis*

^{1,2}Diego Mota Lopes; ^{1,3}Edgar M. Carvalho; ^{1,3}Maria Ilma Araujo; ^{1,2}Robson da Paixão de Souza; ^{1,2}Tarcísio Vila Verde Santana de Almeida; ^{1,2}Jamille Souza Fernandes, ^{1,2,3,5}Luciana Santos Cardoso

¹Serviço de Imunologia, HUPES-UFBA, ²Programa de Pós-graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde-UFBA, ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT) -CNPQ / MCT; ⁴Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; ⁵Faculdade de Farmácia-UFBA, Salvador, Bahia, Brasil.

Apoio Financeiro: INCT-DT (CNPq/MST), FAPESB (APP0015/2011), CNPq e NIH: AI30639-20.

* Autor para correspondência: Luciana Santos Cardoso. Serviço de Imunologia, HUPES, UFBA. Rua João das Botas, S/N, 5º andar, Canela, Salvador-Bahia, Brasil. CEP 40110.160. Phone: 55-71-3237-7353. FAX: 55-71-3245-7110. e-mail: lucianac@ufba.br

Resumo

A co-infecção leishmaniose e esquistossomose têm sido associadas a um maior tempo de cura da lesão cutânea na leishmaniose. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da infecção pela *Leishmania braziliensis* em co-culturas de células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) com linfócitos autólogos de pacientes com esquistossomose e pacientes com leishmaniose cutânea. As MoDCs foram diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico, isolados por esferas magnéticas e em seguida infectadas com *L. braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos. A expressão das moléculas HLA-DR, CD1a, CD83, CD80, CD86, CD40 e do receptor de IL-10 (IL-10R) nas MoDCs e CD28, CD40L, CD25 e CTLA-4 nos linfócitos foram avaliados por citometria de fluxo. A produção das citocinas IL-10, TNF, IL-12p40 e INF- γ foram avaliadas por ELISA sanduiche no sobrenadante das culturas. A avaliação da infectividade foi realizada por microscopia óptica, após concentração células por cytopspin e coloração com Giemsa. Observou-se que as frequências de MoDCs expressando CD83, CD80 e CD86 e o MIF de HLA-DR foram menores no grupo de pacientes com esquistossomose em comparação ao grupo de pacientes com leishmaniose. Por outro lado, as frequências de IL-10R em MoDCs foram maiores nos pacientes com esquistossomose em comparação aos pacientes com leishmaniose. Os linfócitos T CD4 e CD8 dos pacientes com esquistossomose apresentaram uma menor frequência de CD28 e maior frequência de CTLA-4 comparado aos linfócitos dos pacientes com leishmaniose. Os níveis de IL-10 foram mais elevados nos sobrenadantes das co-culturas dos indivíduos com esquistossomose comparadas aos indivíduos com leishmaniose. Por outro lado, os níveis de TNF, IL-12p40 e INF- γ foram menores no grupo de indivíduos com esquistossomose. Em relação frequência de MoDCs infectadas pela *L. braziliensis* nas culturas de 72h foi observado uma maior frequência destas células no grupo de pacientes com esquistossomose, comparados aos pacientes com leishmaniose. Conclui-se que MoDCs de pacientes com esquistossomose são mais susceptíveis a infecção por *L. braziliensis*, possivelmente por apresentarem um menor grau de ativação e um perfil regulatório.

Palavras-chaves: Esquistossomose, leishmaniose, células dendríticas, *L. braziliensis*, infectividade.

6.1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas parasitárias, a exemplo da esquistossomose mansônica (EM) e a leishmaniose cutânea (LC) são um grave problema de saúde pública apresentando-se com uma elevada taxa de morbidade. A imunopatogênese da esquistossomose crônica cursa com predomínio da resposta imune Th2/regulatória a qual é importante para a eliminação do verme e contenção dos ovos de *Schistosoma mansoni*, ao tempo em que parece estar associada à sobrevivência do parasito nos tecidos do hospedeiro (PEARCE E MACDONALD, 2002). Na leishmaniose cutânea a resposta imune predominante é de tipo Th1/inflamatória que está associada com a eliminação parasitária, sendo também responsável pela lesão tecidual observado na doença (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; ANTONELLI *et al.*, 2005). Estudos demonstram que a infecção por helmintos tem capacidade de modular a resposta imune em doenças de base imunológica, a exemplo de asma (MEDEIROS *et al.*, 2003; ARAUJO *et al.*, 2004), doença de Crohn (ELLIOTT *et al.*, 2007), diabetes melitus tipo 1 (COOKE *et al.*, 1999), da infecção pelo HTLV (PORTO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2013) e da leishmaniose (O'NEAL *et al.*, 2007; BAFICA *et al.*, 2011). Tem sido demonstrado que a infecção pelo *Schistosoma mansoni*, ou seus produtos são capazes de modular a resposta inflamatória Th1 (ACTOR *et al.*, 1993; SABIN *et al.*, 1996) envolvidos em algumas doenças imuno-mediadas. Em modelo experimental a co-infetados com *Leishmania* e *Schistosoma* apresentam nódulos linfáticos maiores do que os animais mono-infectados (DORCAS *et al.*, 2007). Outro estudo utilizando camundongos BALBc co-infetados com *L. major* e *S. mansoni* apresentaram uma redução no tamanho da lesão após o tratamento combinado de antimonial pentavalente e praziquantel comparados aos animais tratados separadamente (KHAYEKA-WANDABWA *et al.*, 2013).

Na leishmaniose cutânea humana, a modulação da resposta imune induzida pela infecção com helmintos, dentre eles o *Schistosoma mansoni* tem sido associada a uma alteração na resposta imune e aumento no tempo de cura da lesão cutânea em humanos (O'NEAL *et al.*, 2007). Estudo em humanos mostrou que um total de 51,1% dos pacientes co-infetados com helmintos e *L. braziliensis* apresentaram lesões

persistentes no dia 90 de tratamento com antimonial comparado com 62,2% no grupo que foram tratados os helmintos. A taxa de falha terapêutica em ambos os grupos foi de 57%. O tempo médio de cura foi de 88 dias no grupo controle e de 98 dias no grupo de tratamento com antihelmíntico. Apesar de não haver diferença estatística significativa, os pacientes que receberam tratamento antihelmíntico precoce demoraram mais para curar suas lesões que os pacientes do grupo não tratados. Este estudo mostra que a introdução precoce de terapia antihelmíntica não melhora o desfecho clínico em pacientes co-infectados com helmintos e *L. braziliensis* (NEWLOVE *et al.*, 2011). Estudo recente mostrou que pacientes co-infectados com helmintos intestinais e *Leishmania braziliensis* apresentaram maior frequência de lesões tegumentares e maior tempo para a cicatrização comparada aos pacientes não infectados pelos helmintos (AZEREDO-COUTINHO *et al.*, 2016). Estes indivíduos co-infectados também apresentaram mais falha terapêutica ou recaída em relação aos pacientes não infectados por helmintos. Esses resultados sugerem que as infecções intestinais por helmintos interferem no curso clínico da leishmaniose tegumentar (AZEREDO-COUTINHO *et al.*, 2016).

As células dendríticas (DC) são reconhecidas pela capacidade de sensibilizar linfócitos T não primados, e por contribuírem para a diferenciação funcional de células T regulatórias (YAMAZAKI *et al.*, 2003), além de serem importantes fontes na produção de citocinas e apresentação de antígenos parasitários as células T (DE SAINT-VIS *et al.*, 1998). Os eventos iniciais na infecção pela *Leishmania*, envolvendo os macrófagos e as células dendríticas na apresentação de antígenos do parasito para células T e na produção de citocinas, devem influenciar na resposta do hospedeiro e no curso da infecção. Entende-se que a resposta Th1 seja importante para o controle da infecção, porém as citocinas Th1 podem também estar relacionadas com a patogênese da doença. Por isso é importante a existência de um equilíbrio entre as células Th1 e T regulatórias, e não uma polarização para um tipo de resposta, pois esses mecanismos são importantes para manter a integridade tecidual do hospedeiro contra uma resposta inflamatória exacerbada (BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2007). A resposta do tipo Th2 pode também ser dependente de DCs. Vários patógenos como *Schistosoma sp.* e fungos utilizam as DCs para indução de resposta Th2. Esta resposta Th2 parece ser resultante da ação de alguns antígenos parasitários sobre as DCs (D'OSTIANI *et al.*, 2000; MACDONALD *et al.*, 2001; BACCI *et al.*, 2002).

A infecção experimental de células dendríticas por promastigotas de *L. braziliensis* induz a produção de altos níveis de TNF, o que pode contribuir para uma resposta local de controle parasitário (CARVALHO *et al.*, 2008). O padrão de resposta imune do tipo 1 com produção de IFN- γ , TNF e IL-12, tem sido associado com o controle da infecção por ativação macrófagica e destruição parasitária na leishmaniose humana (ROBERTS *et al.*, 2005; AMEEN *et al.*, 2010). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β , favorecem a multiplicação parasitária, inibindo a produção de NO por macrófagos ativado por IFN- γ podendo também inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1 e sua consequente produção de IFN- γ e TNF (BARATTAMASINI *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2007). Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ atuam como fonte produtora de citocinas envolvidas no processo de ativação de macrófagos na leishmaniose (DA-CRUZ *et al.*, 2002). As DCs podem influenciar na resposta de células T CD4⁺ tanto do tipo 1 (Th1) como do tipo 2 (Th2) (MOSER E MURPHY, 2000). O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da infecção pela *Leishmania braziliensis* em células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) co-cultivadas com linfócitos autólogos de pacientes com esquistossomose e com leishmaniose cutânea.

Desde que estudo tem mostrado que indivíduos infectados pela *Leishmania sp.* co-infectados com helmintos apresentam maior tempo de cura da lesão (O'NEAL *et al.*, 2007) e que em modelo experimental o tratamento associado da leishmaniose e esquistossomose está relacionado no início da doença à redução no tamanho da lesão e em fase mais tardia aumento da área da lesão (LA FLAMME *et al.*, 2002) o objetivo deste estudo foi avaliar moléculas de superfície de células dendríticas de indivíduos com esquistossomose infectadas pela *Leishmania braziliensis*. O entendimento dos mecanismos imunológicos que contribuem para o agravamento do processo inflamatório mediado pelas DCs e linfócitos auxiliará na compreensão dos mecanismos associados a gravidade da leishmaniose nos indivíduos co-infectados.

6.2 METODOLOGIA

6.2.1 População do estudo

Neste estudo foram incluídos três grupos de pacientes, sendo um grupo de pacientes com esquistossomose (n=6), outro grupo de pacientes com leishmaniose cutânea (n=12) e um grupo de indivíduos saudáveis (n=7). Os indivíduos com esquistossomose são residentes em uma área endêmica, localizada no município do Conde no estado da Bahia, Brasil. Neste grupo, 75% dos indivíduos eram do sexo masculino e 25% do sexo feminino, com idade média de $35,5 \pm 22,4$ anos. O critério de diagnóstico foi baseado na presença de ovos de *Schistosoma mansoni* em pelo menos uma amostra de parasitológico de fezes pelo método de Hoffman. Todos apresentavam alta carga parasitária (>200 opg) pelo método de Kato-Katz (KATZ *et al.*, 1970). Para compor o grupo de pacientes com leishmaniose foram incluídos doze pacientes com leishmaniose cutânea (LC) que residem em área endêmica, conhecida como Corte de Pedra, localizada na região sudeste do estado da Bahia, Brasil, sendo 67% dos pacientes do sexo masculino e 33% do sexo feminino, com idade média de $33,5 \pm 14,5$ anos. Os critérios para o diagnóstico foram compostos por apresentação clínica característica de LC (lesões granulomatosas ulceradas na pele), isolamento do parasito, hipersensibilidade do tipo retardada positiva (DTH) em resposta ao antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) ou as características histológicas de LC nas biópsias. Três amostras de fezes de cada indivíduo foram examinadas usando o método de sedimentação Hoffman para excluir indivíduos infectados com *S. mansoni* nos indivíduos com LC e controle saudável. Dos 12 pacientes avaliados 42% apresentaram apenas uma lesão característica de leishmaniose e 58% apresentavam entre duas e quatro lesões. O grupo de controles saudáveis foi composto por indivíduos residentes em Salvador, sendo 70% dos pacientes do sexo masculino e 30% do sexo feminino, com idade média de 28 ± 15 anos.

O Comitê de Ética da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) aprovou o presente estudo (licença número 0603110287514). Todos os indivíduos que foram convidados para participar do estudo e que concordaram, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

6.2.2 Geração *in vitro* de células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs), infecção com *L. braziliensis* e co-cultivo com linfócitos autólogos

As células dendríticas de pacientes com esquistossomose e leishmaniose foram diferenciadas a partir de monócitos (MoDCs). Sangue total foi adquirido por punção venosa e coletado em tubo contendo heparina sódica. Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas através do gradiente de Ficoll-Hypaque e ajustadas para concentração de 1×10^7 células/mL em RPMI 1640 completo (100 μ L/mL de gentamicina, L-glutamina 2mM, 30mM HEPES), contendo 10% de Soro Fetal Bovino inativado (Life technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Os Monócitos (CD14⁺) foram isolados das CMSP utilizando-se Beads Magnéticas (Monocyte Isolation Kitt II human, MACS, Miltenyi Biotec) por seleção negativa, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3⁺, CD56⁺, CD16⁺, CD7⁺, CD19⁺ e Glycophorin A⁺. Os linfócitos resultantes da separação dos monócitos por BEADS magnéticas foram armazenados em -70°C em meio DMSO + 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) por sete dias para posterior co-cultivo com as MoDCs. Os Monócitos foram incubados a 37°C, 5% de CO₂ por 7 dias com 3mL/poço de RPMI completo contendo 800UI/mL de IL-4 (Peprotech) e 50ng/mL de GM-CSF (Peprotech) em placas de 6 poços, onde foram cultivados na concentração de 2×10^6 monócitos/mL (50 μ L) para diferenciação em células dendríticas. A pureza dos monócitos foi >80%. A pureza dos linfócitos foi >90%. Após 7 dias de cultura, as MoDCs (CD11c⁺) foram coletadas lavando-se os poços 3x com meio RPMI. Em seguida, as MoDCs foram infectadas pelas promastigotas de *L. braziliensis*, previamente incubadas com meio RPMI + 10% SFB, na concentração de 1:5 por um período de 2h a 37°C, 5% de CO₂. Após esse período as células foram lavadas 3x com meio RPMI completo com a finalidade de retirar as promastigotas que não infectaram. Em seguida os linfócitos foram descongelados lentamente em banho-maria a 37°C, lavados com PBS 1x e ajustados para o co-cultivo com as células dendríticas na proporção de 10 linfócitos para uma MoDC.

6.2.3 Avaliação do fenótipo e do estado de ativação das células dendríticas e linfócitos após infecção com *Leishmania braziliensis*

A expressão de moléculas de ativação e regulação nas MoDCs e nos linfócitos foram avaliados por citometria de fluxo. A percentagem de células CD11c⁺ (MoDCs) para todos os experimentos foram $\geq 90\%$ (dados não mostrados). Resumidamente, MoDCs e os linfócitos após 24 de cultivo foram coletadas, marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromo para avaliar moléculas na superfície celular. MoDCs foram recolhidos por centrifugação a 1100 rpm durante 10 minutos e ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, inativado pelo calor) (Gibco, Invitrogen). As células dendríticas (DC) foram coradas com anticorpos monoclonais anti-humanos conjugados com fluorocromos contra as seguintes moléculas da superfície celular: CD11c-APC (clone 3.9), CD1a-FITC (clone HI149), IL-10R α -PE (policlonais), CD40-PerCP-e Fluor 710 (clone 5C3), CD80-PerCP-e Fluor 710 (clone 2D10.4), CD86-PE (clone IT2.2), CD83-PE-Cy7 (HB15e clone), HLA-DR-PerCP-Cy5.5 (clone LN3) (todos da eBioscience, Califórnia). Os linfócitos foram corados com conjugado de anticorpos monoclonais anti-humanos conjugados com fluorocromos contra as seguintes moléculas da superfície celular: CD3-PE-Cy7 (clone UCHT1) ou CD3-PerCP-Cy5.5 (clone SK7), CD4-APC (clone OKT4), CD8-FITC (clone RPA-T8), CTLA-4-PE (clone 14D3), CD40L-PE (clone 24-34), CD25-PE-Cy7 (clone BC96) e CD28-PerCP-Cy5.5 (clone CD28.2) (todos da eBioscience, Califórnia). Em seguida, foram analisadas para 100000 eventos por amostra usando um citômetro de fluxo (FACSCanto, Becton Dickinson). Os limites para os marcadores positivos foram definidos com base em populações negativas e controles de isotipo (dados não mostrados).

A frequência de células positivas foi analisada utilizando o programa FlowJoTM (Tree Star, USA). A região contendo a população de MoDCs e linfócitos foi definida por fluorescência inespecífica com dispersão frontal (FSC) e de dispersão lateral (SSC), como parâmetros de tamanho de célula e granularidade, respectivamente. As células dendríticas foram definidas com base na sua granularidade e expressão de CD11c⁺, já os linfócitos foram definidos com base na sua granularidade e expressão de CD3⁺.

6.2.4 Determinação dos níveis das citocinas

Os níveis das citocinas IL-10, IL-12p40, INF- γ e TNF foram avaliados nos sobrenadantes das co-culturas de MoDCs com linfócitos, segundo informações do fabricante (Pharmingen, San Diego, CA). Resumidamente, placas (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp surface, Dinamarca) foram sensibilizadas durante 24h, a 4°C com anticorpo monoclonal anti-citocina humana (IL-10, IL-12p40, INF- γ e TNF) na concentração de 4 μ g/mL. No dia seguinte, após lavagem das placas com PBS Tween 0,05% foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com PBS + albumina bovina 0,01% por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS/Tween 0,05%, e adicionando amostras, brancos e a curva-padrão que foram incubados à temperatura ambiente por duas horas. A placa foi lavada novamente três vezes e adicionado o anticorpo de detecção anti-citocina humana biotilado (2 μ g/mL). Após incubar uma hora a temperatura ambiente as placas foram lavadas 4 vezes e foi adicionado o conjugado (peroxidase conjugada à streptavidina). A placa foi incubada por trinta minutos a temperatura ambiente. Após lavagem adicionou-se o substrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina + H₂O₂ + dimetilsulfóxido) e a placa foi incubada 20 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ (8M). A densidade óptica (D.O.) foi lida a 450nm (Spectramax, Molecular Devices Corporation Sunnyvale, CA.) e os valores convertidos em pg/mL baseando-se na curva padrão (Soft Max Pro 5.0 Molecular Devices Corporation Sunnyvale, CA).

6.2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA EUA). As diferenças entre as frequências e infectividade de MoDCs, frequências de linfócitos e os níveis das citocinas entre grupos foram avaliadas por ANOVA não paramétrica (Teste de Kruskal Wallis com pós teste de Dunns). As frequências de células positivas foram expressas em mediana (mínimo e máximo) da porcentagem ou a média de intensidade de fluorescência (MIF). As concentrações das citocinas foram expressas em média e desvio padrão (pg/mL). A significância estatística foi estabelecida no intervalo de confiança de 95%.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Perfil de molécula de ativação, maturação, co-estimulatória e regulatória das MoDCs de pacientes com esquistossomose, leishmaniose e controle

As MoDCs de pacientes com esquistossomose e indivíduos controles infectadas pela *L. braziliensis* apresentaram uma menor média de intensidade de fluorescência (MIF) da molécula de ativação HLA-DR [36,6 (9,04-64,30 MIF); 31,3 (16-93 MIF), respectivamente] comparadas as MoDCs de pacientes com leishmaniose [46,7 (5,37-76,6 MIF); * $p < 0,05$, figura 1A]. A frequência de MoDCs expressando as moléculas co-estimulatórias CD80 foram menores nos pacientes com esquistossomose [7,29% (5,09–12,70)] comparadas aos pacientes com leishmaniose [CD80: 24,75% (19,00-53,60%), * $p < 0,05$, figura 1B]. Também foi observado que a frequência de MoDCs expressando as moléculas co-estimulatórias CD86 foram menores nos pacientes com esquistossomose [CD86: 49,45% (37,60-59,90%)] comparadas aos pacientes com leishmaniose ou controle saudável [CD86: 86,85% (41,40-97,805%); 75% (42-90%), respectivamente, * $p < 0,05$, figura 1C]. Ao avaliarmos a maturação nas MoDCs observamos que a frequência de células expressando a molécula CD83 foram menores nos pacientes com esquistossomose [CD83: 17,6% (5,73-28,60%)] comparadas aos pacientes com leishmaniose [CD83: 29,60% (16,10-62,60%), respectivamente; * $p < 0,05$, Figura 1D]. A frequência de MoDCs expressando as moléculas co-estimulatórias CD40 foram maiores nos pacientes com esquistossomose [21% (14–39%)] e pacientes com leishmaniose [CD40: 29% (17-60%) comparadas aos controles saudáveis [7% (6–8%); ** $p < 0,005$, figura 1E]. Por fim, na avaliação fenotípica das MoDCs, observou-se aumento da frequência dessas células expressando a molécula de regulação receptor de IL-10 (IL-10R) dos pacientes com esquistossomose [34,45% (16,80–63,10%)] em comparação aos pacientes com leishmaniose [16,15% (7,18-25,40%); * $p < 0,05$, figura 1F]. A frequência de MoDCs expressando IL-10R foram maiores nos pacientes com esquistossomose e pacientes com leishmaniose comparadas aos controles saudáveis [9% (3–19%); * $p < 0,05$, figura 1F]. Não houve diferença em relação à frequência de MoDCs que expressam CD1a dentre os grupos de pacientes avaliados (dados não mostrados).

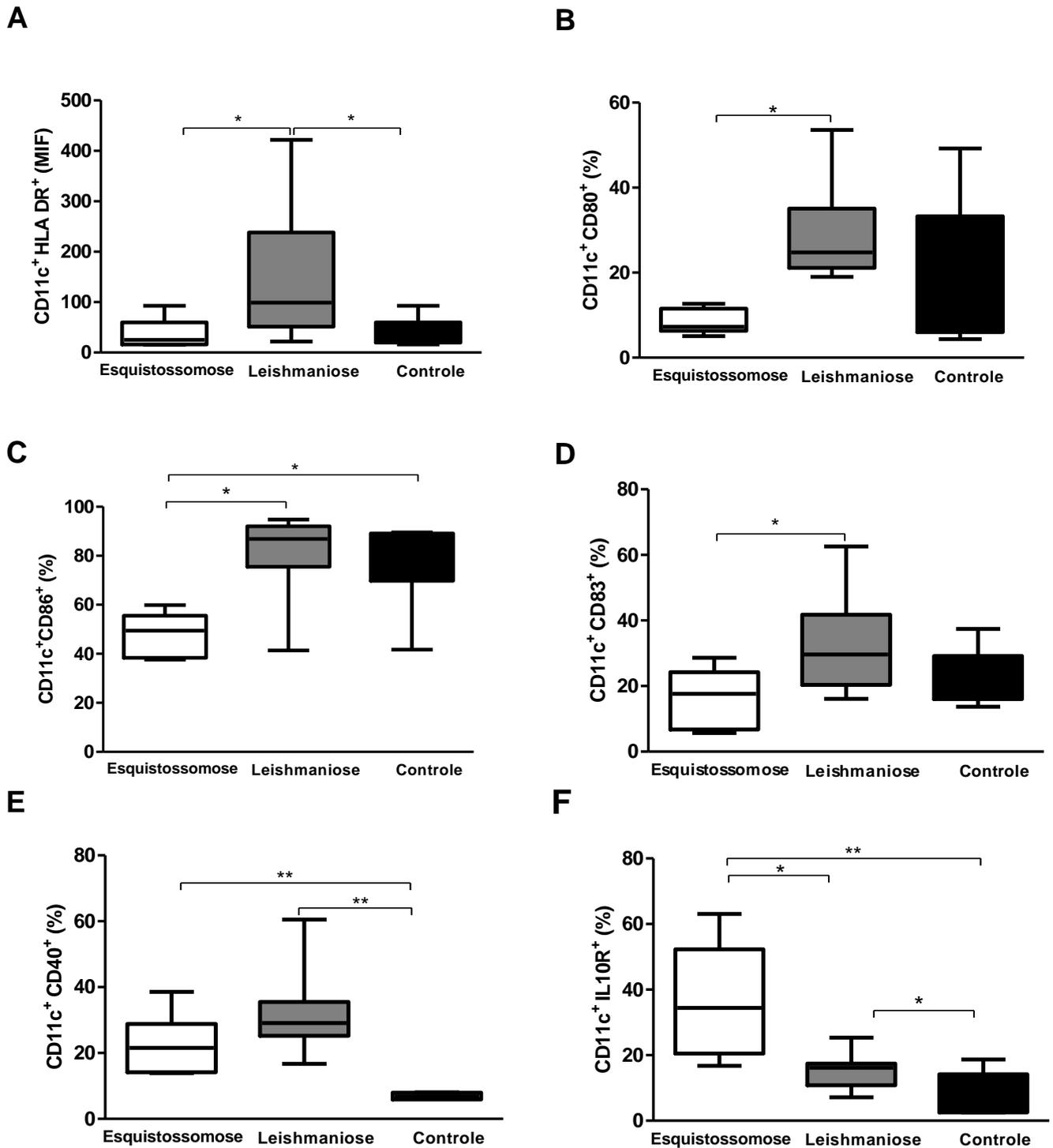


Figure 1. Frequência de moléculas de ativação, co-estimulatória, maturação e de regulação nas MoDCs de pacientes com esquistossomose e pacientes com leishmaniose infectadas pela *L. braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos. (A) CD11c⁺HLA-DR⁺ (MIF), (B) CD11c⁺CD80⁺ (%), (C) CD11c⁺CD86⁺ (%), (D) CD11c⁺CD40⁺ (%), (E) CD11c⁺CD83⁺ (%) e (F) CD11c⁺IL-10R⁺ (%). *p<0,05; **p<0,005. Teste Kruskal Wallis.

6.3.2 Avaliação do perfil de molécula de ativação e regulação nos linfócitos T auxiliares CD4 de pacientes com esquistossomose, leishmaniose e controles

Ao avaliarmos o perfil dos linfócitos T entre os grupos observou-se que os pacientes com leishmaniose apresentam maior frequência de linfócitos T CD4 [58,00% (36,00-082,50) comparados ao controle saudável [45% (18-65%); * $p < 0,05$, figura 2A]. Em relação ao perfil de ativação desses linfócitos T CD4 observamos que os pacientes com esquistossomose apresentaram uma menor frequência da molécula de ativação CD28 [17,80% (12,60-65,20%) em comparação as do paciente com leishmaniose ou ao controle saudável [52,70% (16,70-76,20%); 69% (22-97%), * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$, respectivamente, figura 2B]. Em relação a frequência de linfócitos TCD4⁺CD40L⁺ observou-se que os pacientes com esquistossomose apresentavam uma maior frequência dessa molécula [7,59% (1,15-19,30%)] comparados aos pacientes com leishmaniose [2,40% (1,27-4,96%); * $p < 0,05$, figura 2C]. Em relação a frequência de linfócitos TCD4⁺CD25^{low} observou-se que os pacientes com esquistossomose apresentavam uma menor frequência dessa molécula [5,4% (4,6-5,5%)] comparados aos controles saudáveis [8,1% (2,0-22%); * $p < 0,05$, figura 2D]. Não houve diferença entre os três grupos de pacientes em relação à frequência de linfócitos T CD4⁺CD25^{high} (Figura 2E). Em relação as moléculas associada a regulação da resposta imune CTLA-4 nos pacientes com esquistossomose observou-se uma maior frequência de linfócitos TCD4⁺CTLA4⁺ [7,72% (3,93-10,80)] comparados aos pacientes com leishmaniose ou ao controle saudável [1,93% (0,10-4,50); 2,5% (0,4-6,8); *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$, respectivamente, figura 2F].

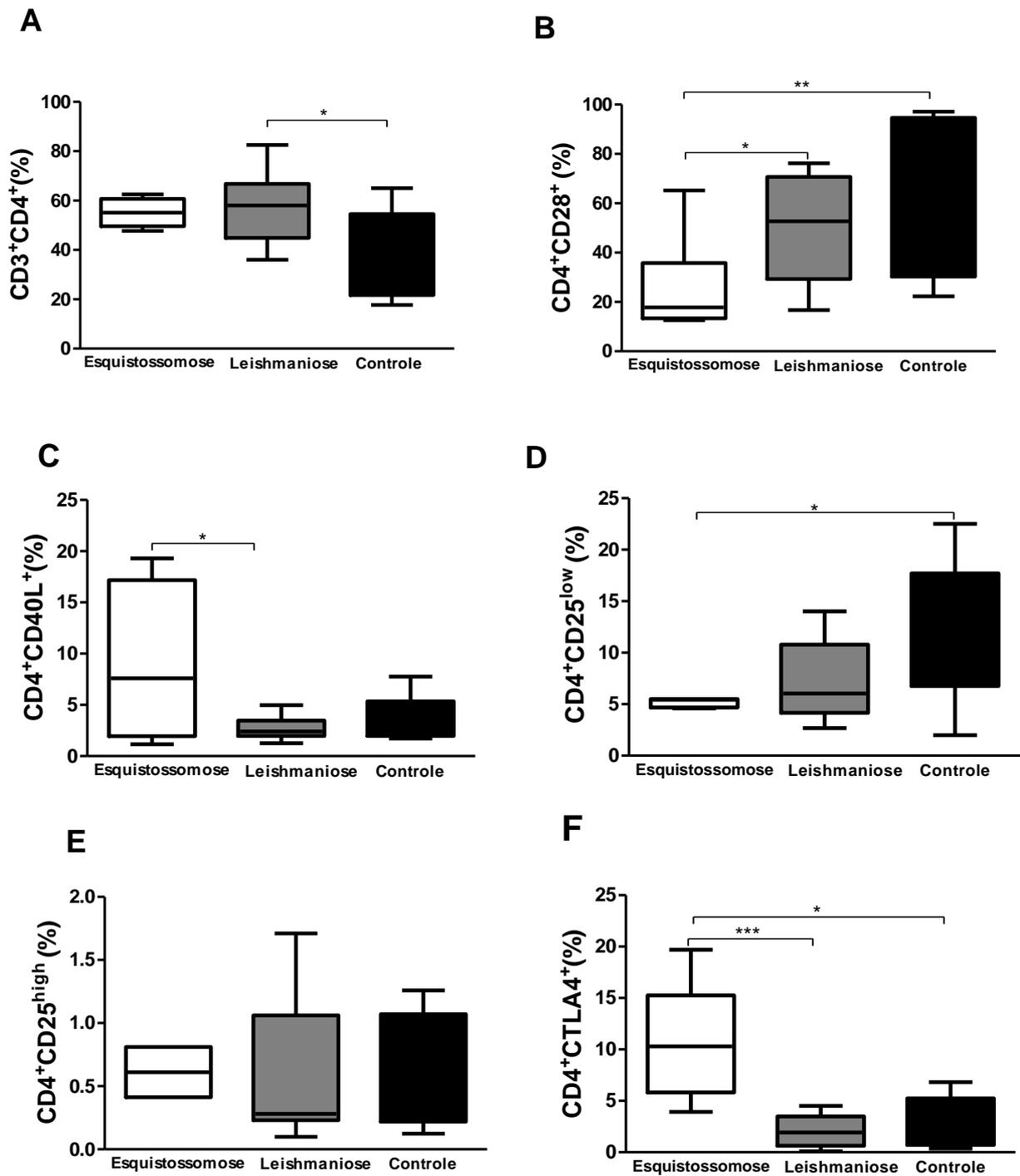


Figure 2. Frequência de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (A) expressando as moléculas co-estimulatórias CD4⁺CD28⁺ (B), CD4⁺CD40L⁺ (C), CD4⁺CD25^{low} (D), CD4⁺CD25^{high} (E) e CD4⁺CTLA4⁺ (F) após 24h de co-cultivo com MoDCs infectadas por 2h pela *L. braziliensis*. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,001. Teste Kruskal Wallis.

6.3.3 Avaliação do perfil de molécula de ativação e regulação nos linfócitos T citotóxicos CD8 de pacientes com esquistossomose, leishmaniose e controle

Ao avaliarmos o perfil dos linfócitos T CD8 entre os grupos observamos que os pacientes com esquistossomose apresentam maior frequência desses linfócitos [22% (18-28) comparados ao controle saudável [14% (8-24%); * $p < 0,05$, figura 3A]. Em relação a frequência de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ observamos que os pacientes com esquistossomose apresentavam uma menor frequência dessas células [9,02% (6,81-17,70)] comparadas aos dos pacientes com leishmaniose [34,55% (23,70-60,90); * $p < 0,05$, figura 3B]. Também observamos uma menor frequência de CD40L nos linfócitos T CD8 dos pacientes com esquistossomose [1,21% (1,12 - 3,01)] comparados aos dos pacientes com leishmaniose [8,44% (5,30 -23,50); * $p < 0,05$, figura 3C]. Em relação à frequência linfócitos T CD8⁺CD25⁺ observamos uma maior frequência desta molécula no grupo de pacientes com leishmaniose [8,34% (5,13-14,20)] comparadas ao grupo de pacientes com esquistossomose ou controle saudável [3,20% (2,52-5,31); 2% (1-8); ** $p < 0,005$, * $p < 0,05$, respectivamente, figura 3D]. Por outro lado, os linfócitos T CD8 dos pacientes com esquistossomose apresentavam uma maior frequência de expressão de CTLA-4 [11,3% (9,61 - 16,5%)] comparadas aos pacientes com leishmaniose ou controle saudável [6,45% (2,25-11,80); 3% (3-7) respectivamente, * $p < 0,05$, figura 3F]. Observamos uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺CTLA-4⁺ nos pacientes com leishmaniose em relação aos indivíduos controles saudáveis (Figura 3F).

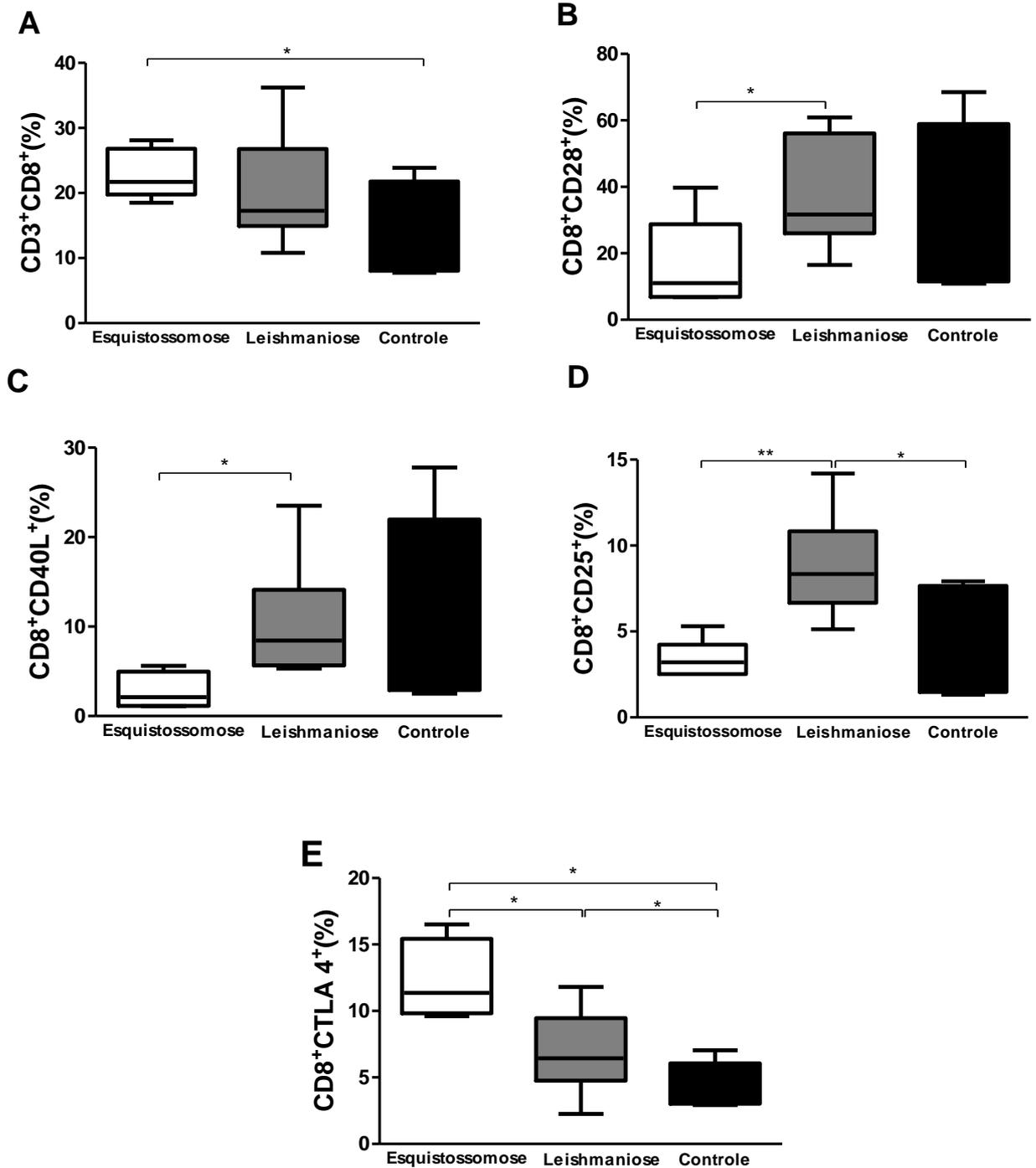


Figure 3. Frequência de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ (A) expressando as moléculas co-estimulatórias $CD8^+CD28^+$ (B), $CD8^+CD40L^+$ (C), $CD8^+CD25^+$ (D) e $CD8^+CTLA-4^+$ (E) após 24h de co-cultivo com MoDCs infectadas por 2h pela *L. braziliensis*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$. Teste Kruskal Wallis.

6.3.4 Avaliação da produção de citocinas nas co-culturas de dendríticas infectadas com *L. braziliensis* e linfócitos autólogos de pacientes com esquistossomose, pacientes com leishmaniose e controle saudável

Ao avaliarmos a produção das citocinas no sobrenadante das co-culturas de MoDCs infectadas com *Leishmania braziliensis* e linfócitos autólogos observamos que as culturas dos pacientes com esquistossomose apresentam maiores níveis de IL-10 ($1090 \pm 134,6$ pg/mL) comparadas aos pacientes com leishmaniose ou controle saudável [171 ± 134 pg/mL; 52 ± 59 pg/mL, respectivamente, $***p < 0,001$; Figura 4A). Observamos que as culturas dos pacientes com leishmaniose apresentam maiores níveis de IL-10 comparadas as dos controles saudáveis (Figura 4A). Em relação aos níveis das citocinas IL-12p40, TNF e INF- γ nos sobrenadantes das co-culturas de MoDCs infectadas e linfócitos autólogos observamos menores níveis de IL-12p40 ($235,9 \pm 8,3$ pg/mL), TNF ($15,9 \pm 0,83$ pg/mL) e INF- γ ($92,7 \pm 87,9$ pg/mL) nas culturas do grupo de pacientes com esquistossomose comparados as culturas dos pacientes com leishmaniose [IL-12p40: 1405 ± 1003 pg/mL; TNF: $746,8 \pm 38,67$ pg/mL; INF- γ : 1810 ± 684 pg/mL; $*p < 0,05$, $**p < 0,005$; Figura 4A, B, C e D, respectivamente). Observamos ainda que as culturas dos pacientes com esquistossomose apresentavam menores níveis de IL-12p40 ($235,9 \pm 8,3$ pg/mL) em relação aos controles saudáveis ($426,2 \pm 174,6$ pg/mL; $*p < 0,05$, figura 4B). Observamos também que as culturas dos pacientes com leishmaniose apresentavam maiores níveis de TNF ($746,8 \pm 38,67$ pg/mL) e INF- γ (1810 ± 684 pg/mL) em relação as dos controles saudáveis [TNF: 17 ± 3 pg/mL; INF- γ : 63 ± 27 pg/mL; $*p < 0,05$, $**p < 0,005$; Figura 4 C e D, respectivamente).

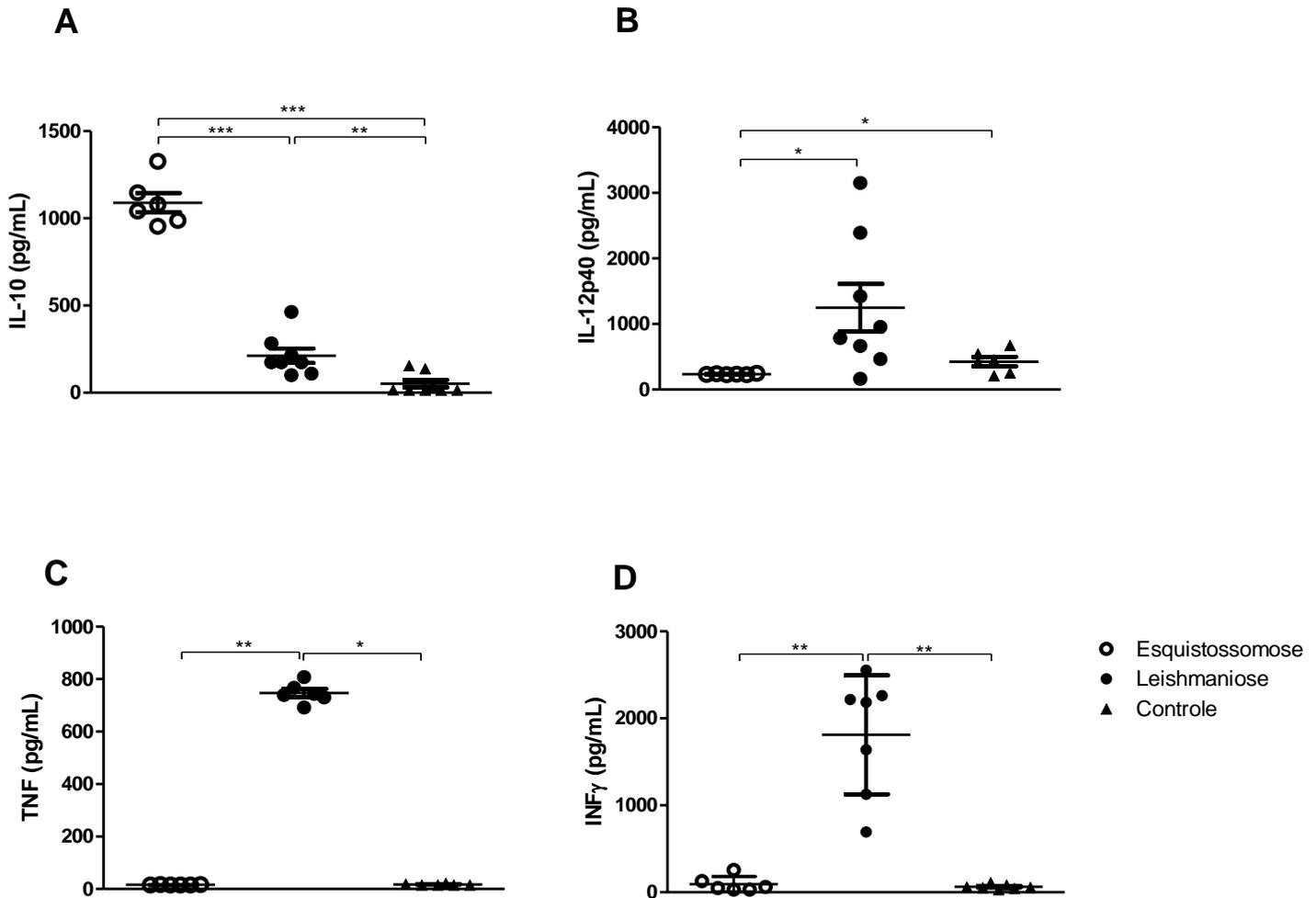


Figure 4: Produção de citocinas das culturas de dendríticas infectadas por 2h pela *L. braziliensis* após 24h de co-cultivadas com linfócitos autólogos de pacientes com esquistossomose, leishmaniose e controle. (A) IL-10, (B) IL-12p40, (C) TNF e (D) INF- γ . * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$. Teste Kruskal Wallis.

6.3.5 Avaliação da taxa de infecção das MoDCs de pacientes com esquistossomose, leishmaniose e controles

Por fim, avaliamos a frequência das MoDCs infectadas pela *L. braziliensis* e o número de amastigotas intracelulares em 100 células observadas. Após 72h de cultura, observamos uma maior frequência de MoDCs infectadas pela *L. braziliensis* (78% \pm 9) no grupo de pacientes com esquistossomose comparadas às células dos pacientes com leishmaniose ou dos controles saudáveis [51% \pm 20; 42% \pm 8, respectivamente, *** p <0,001, figura 5A). Não houve diferença estatística em relação a frequência de MoDCs infectadas entre os três grupos nos tempos de cultura avaliados em 2h, 24h e 48h após a infecção. Em relação aos números de amastigotas de *Leishmania braziliensis* em 100 MoDCs avaliadas após 2h, 24h, 48h (dados não mostrados) e 72h (Figura 5B) da infecção, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos de pacientes com esquistossomose comparados aos de leishmaniose. Não foi possível realizar a avaliação após 96h devido ao número baixo de células encontradas.

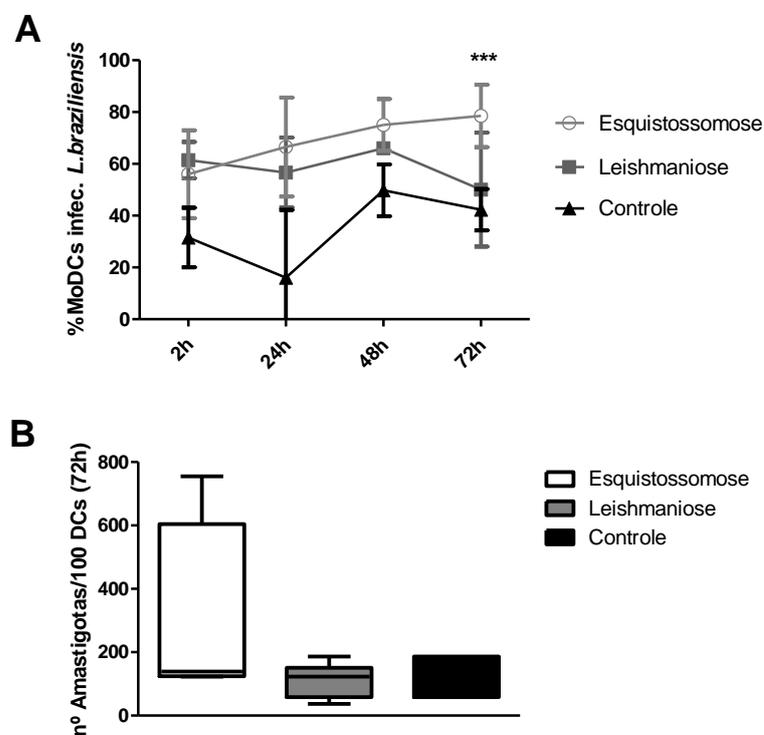


Figure 5. Cinética da frequência de MoDCs infectadas por 2h pela *L. braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos por 24h (A). Número de amastigotas intracelular em 100 células avaliadas (B) por microscopia óptica (100X). *** p <0,001. Teste Kruskal Wallis.

6.4 DISCUSSÃO

Poucos estudos tem avaliado o efeito da co-endemicidade *Schistosoma mansoni* e *Leishmania braziliensis*. Alguns estudos têm mostrado que o helminto *Schistosoma mansoni* e o protozoário *Leishmania sp.* são co-endêmicos (BUTTERWORTH *et al.*, 1996; O'NEAL *et al.*, 2007). As infecções pela *Leishmania braziliensis* resultam em lesões cutâneas localizadas na qual sua resolução depende do desenvolvimento de uma forte resposta Th1 efetora (CARVALHO *et al.*, 1994) enquanto que as infecções com *S. mansoni* cursam com uma resposta imunológica predominante do tipo Th2 onde na fase crônica observa-se um aumento da resposta T regulatória que estaria associado ao controle parasitário (DUNNE *et al.*, 2005). A interação entre estes dois patógenos *in vitro* foi avaliada neste estudo pela infecção de células dendríticas de pacientes com esquistossomose pela *Leishmania braziliensis*. A infecção de células dendríticas de pacientes com esquistossomose com *L. braziliensis* apresentou um perfil fenotípico associado a regulação, tanto nas MoDCs como nos linfócitos. Observamos também que as culturas dos pacientes com esquistossomose apresentavam uma maior produção da citocina regulatória IL-10 e uma menor produção das citocinas inflamatórias IL-12p40, TNF e INF- γ que são importantes para a eliminação intracelular desse protozoário. Este perfil menos ativado das células dendríticas associado a um perfil regulatório dos linfócitos dos pacientes com esquistossomose levou a uma maior taxa de infecção nessas células apresentadoras de antígenos comparadas às dos pacientes com leishmaniose cutânea.

A capacidade de um ambiente Th2 preexistente em modular a resposta Th1 *in vitro* é importante no entendimento de como uma modulação da resposta pode afetar o desenvolvimento da doença. O mecanismo pelo qual a resposta imune (Th2/Treg) induzida pelo *Schistosoma mansoni* modula a resposta Th1 não está totalmente definido. Um dos fatores que podem contribuir para a regulação da resposta Th1 é a produção de IL-10 e TGF- β (KING *et al.*, 1996). Ambas as citocinas são produzidas em altos níveis durante a infecção por *Schistosoma sp.* (PEARCE *et al.*, 1991) e podem impedir a morte da *Leishmania sp.* nos macrófagos que é dependente de INF- γ (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; VOULDOUKIS *et al.*, 1997; LOUZIR *et al.*, 1998). Os resultados apresentados em nosso estudo mostraram que as células dendríticas, *in vitro*, de pacientes com esquistossomose se infectam mais pela

Leishmania braziliensis do que às dos pacientes com leishmaniose. Estudos sugerem o envolvimento de IL-10 nessa susceptibilidade, porém ainda precisa de mais investigações para esclarecer esses mecanismos. A redução da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-12 nas culturas de pacientes com esquistossomose também podem estar relacionado com a maior taxa de infecção nas células dendríticas desses pacientes.

Sabe-se que em estudo experimental a infecção prévia pelo *Schistosoma mansoni* levou a um retardo na resolução das lesões cutâneas e da parasitemia durante a infecção com *Leishmania major*. Esta co-infecção com *S. mansoni* resultou em uma diminuição da produção de INF- γ , TNF e NO produzidos pelas células de linfonodos drenantes após a infecção com *L. major*. Por outro lado, essas células aumentaram a produção de IL-4 (LA FLAMME *et al.*, 2002). Em estudo de co-infecção entre *Schistosoma mansoni* e vírus da hepatite C, mostrou que a persistência do vírus e o desenvolvimento de hepatite crônica também aumentam em pacientes co-infectados (ELREFAEI *et al.*, 2003). Esse mecanismo dos helmintos em modular a resposta imune pode estar relacionado à indução da citocina IL-10 que altera a resposta celular e contribui para a expansão das células T reguladoras (ARAUJO *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005).

Neste estudo foi observado que MoDCs de pacientes com esquistossomose, infectadas pela *L. braziliensis* apresentavam uma menor expressão de HLA-DR comparadas as MoDCs de pacientes com leishmaniose. Existem estudos mostrando que as células dendríticas de pacientes infectados com *S. hematobium* apresentam uma menor expressão de HLA-DR comparada às de indivíduos não infectados pelo helminto (NAUSCH *et al.* 2012; EVERTS *et al.*, 2010). MoDCs de indivíduos saudáveis estimuladas com antígeno solúvel do ovo de *Schistosoma mansoni* (SEA) não apresentaram diferença quanto a expressão de HLA-DR comparadas as células não estimuladas (REIS *et al.*, 2007). Dados indicam que MoDCs estimulada com antígeno solúvel do ovo de *Schistosoma mansoni* (SEA) *in vitro* exibem um nível de ativação menor do que a induzida por estímulos de maturação convencionais, tais como LPS (lipopolissacarideo de bactérias) (AGRAWAL *et al.*, 2003). Não só o SEA como outros antígenos que fazem parte de diferentes fases do ciclo de vida do *Schistosoma*, a exemplo do antígeno solúvel do esquistossômulo (SSA) e antígeno solúvel do verme adulto (SWA) também não conseguem ativar convencionalmente células dendríticas em modelo experimental (ZACCONE *et al.*, 2003; TROTTEIN *et*

al., 2004). DCs de camundongos co-infectados com *S. japonicum* e *Plasmodium berghei* apresentam menor expressão de HLA-DR e CD86 do que os DCs de camundongos monoinfectados com *P. berghei* (WANG *et al.*, 2013). Em nosso estudo a frequência de MoDCs expressando as moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e a molécula de maturação CD83 foram menores nos pacientes com esquistossomose comparadas aos pacientes com leishmaniose. Antígenos de *Schistosoma* reduzem a expressão de MHC classe II, CD80, CD86 e diminuem a produção de IL-12 por DC de camundongos estimuladas com LPS (MACDONALD *et al.*, 2002; JANKOVIC *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2012)

Não houve diferença entre os dois grupos de pacientes em relação a frequência de MoDCs expressando CD1a e CD40. A ativação de DC por *S. mansoni* é promovida pela interação CD40:CD154 e inibida por IL-10. DC isoladas a partir de camundongos (knockout CD154) infectados por *S. mansoni* exibiram baixo nível de ativação (STRAW *et al.*, 2003), enquanto as DC isoladas a partir de camundongos (knockout IL-10) apresentavam um fenótipo hiper-ativado (MCKEE *et al.*, 2004). Embora DC estimuladas com SEA não aumente a expressão do CD40 (MACDONALD *et al.*, 2001), a deficiência dessa molécula ou de CD154 impedem o desenvolvimento de uma resposta efetora Th2 nesses camundongos (MACDONALD *et al.*, 2002). Já se sabe que a produção de IL-12 e polarização de uma resposta Th1 em DC é mediada por CD40 (CELLA *et al.*, 1996) e este envolvimento pode estar relacionado nas respostas de células T CD8⁺ (BENNETT *et al.*, 1998; RIDGE *et al.*, 1998).

Tem sido demonstrado que células dendríticas imaturas são mais eficientes em induzir células T regulatórias (reviewed SUCIU-FOCA *et al.*, 2005) e que o co-cultivo de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC) de camundongos com células T CD4⁺ estimuladas com o antígeno recombinante do *Schistosoma japonicum* rSj16 interfere na maturação de BMDC, ao tempo em que induz a polarização de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (SUN *et al.*, 2012).

Outro estudo avaliando DC de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni* exibiu um aumento de 2 a 3 vezes na expressão de MHC de classe II, CD80, e CD40 em comparação a DCs de animais não infectadas, sem, no entanto, apresentarem aumento na produção de IL-12 durante a infecção com *S. mansoni* (STRAW *et al.*, 2003). Por outro lado, a infecção por *T. gondii*, resultou num aumento na expressão de moléculas associadas à ativação (MHC de classe II, CD80, CD86 e

CD40) e promoveu elevada produção de IL-12 por DC (STRAW *et al.*, 2003). Nesse estudo de Straw foi observada maior ativação das DCs nos camundongos infectados por *T. gondii* em comparação com animais infectados por *S. mansoni* (STRAW *et al.*, 2003).

Em relação a avaliação da expressão do receptor de IL-10R na célula apresentadora de antígeno observou-se aumento da frequência de MoDCs expressando o IL-10R⁺ no grupo de pacientes com esquistossomose em comparação aos pacientes com leishmaniose. Dados do nosso grupo mostraram que células dendríticas de pacientes com leishmaniose cutânea após serem estimuladas com antígeno do tegumento do *Schistosoma mansoni* (rSm29) e antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) aumentaram a expressão de IL-10R⁺ quando comparadas as culturas estimuladas com SLA apenas (LOPES *et al.*, 2014).

Em nosso estudo observamos que os pacientes com esquistossomose apresentam menor frequência de linfócitos T CD4⁺ comparados aos controles saudáveis. Em relação ao perfil de ativação desses linfócitos T CD4⁺ observamos que os pacientes com esquistossomose apresentaram uma menor frequência da molécula de ativação CD28⁺ em comparação aos linfócitos T CD4⁺ dos pacientes com leishmaniose. Existe evidência de que a interação B7:CD28 pode ser importante para o desenvolvimento da resposta do tipo Th2 durante a infecção pelo *S. mansoni* (SUBRAMANIAN *et al.*, 1997; HERNANDEZ *et al.*, 1999; RUTITZKY *et al.*, 2003). Esta menor expressão do marcador de ativação dos linfócitos T CD4⁺ pode estar associada a uma deficiência na função efetora necessária para a eliminação da *Leishmania*.

Quanto ao perfil da molécula de ativação CD40L⁺ nesses linfócitos T CD4⁺ observamos que os pacientes com esquistossomose apresentavam uma maior frequência dessa molécula comparada aos pacientes com leishmaniose. Nos pacientes com esquistossomose observamos uma maior frequência de linfócitos CD4⁺ expressando CTLA-4⁺ comparadas aos linfócitos CD4⁺ de pacientes com leishmaniose. Não houve diferença entre os dois grupos de pacientes em relação à frequência de linfócitos CD4⁺ expressando CD25^{low}, CD25^{high}. Bafica e cols. mostraram um aumento de linfócitos T CD4⁺ expressando CTLA-4⁺ em PBMC de pacientes com LC quando estimulados com os antígenos de *Schistosoma mansoni* (BAFICA *et al.*, 2012).

Quanto à avaliação das moléculas nos linfócitos T CD8⁺ assim como observado em relação aos linfócitos T CD4⁺ foi observado uma menor frequência dessas células expressando CD28⁺ no grupo de pacientes com esquistossomose comparada ao grupo de pacientes com leishmaniose. Também observamos uma menor frequência de CD40L⁺ nos linfócitos T CD8⁺ dos pacientes com esquistossomose comparada aos dos pacientes com leishmaniose. Ao avaliarmos a expressão da molécula CD25⁺ observamos uma menor frequência dessa molécula nos linfócitos CD8⁺ dos pacientes com esquistossomose comparada aos dos pacientes com leishmaniose. Por outro lado, os linfócitos T CD8⁺ dos pacientes com esquistossomose apresentavam uma maior frequência de CTLA-4⁺ do que nos pacientes com leishmaniose.

Na co-infecção pelo helminto *Heligsomosoides polygyrus* e o protozoário *Toxoplasma gondii*, a resposta induzida pelo nematódeo suprime a resposta de linfócitos T CD8⁺ com diminuição de IFN- γ (MARPLE *et al.*, 2017).

Ao avaliarmos a produção das citocinas no sobrenadante das culturas de células dendríticas infectadas com *Leishmania braziliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos observamos que no grupo de paciente com esquistossomose houve maiores níveis de IL-10 e menores níveis de IL-12p40, IFN- γ e TNF comparadas às culturas dos pacientes com leishmaniose. Dados do nosso grupo mostram que PBMC de pacientes com leishmaniose após serem estimuladas com antígenos de *Schistosoma mansoni* foram capaz de aumentar a produção de IL-10 e diminuir a produção de TNF e INF- γ nessas culturas (BAFICA *et al.*, 2011). O IL-10 derivado das DC pode limitar a expansão Th1 através da própria inibição de IL-12 (CORINTI *et al.*, 2001) ou pela sua capacidade de estimular a produção de IL-10 a partir de células T (MCGUIRK *et al.*, 2002) podendo diminuir assim a produção das citocinas TNF e INF- γ . Sabe-se que a infecção por helminto induz IL-10 o qual é capaz de modular resposta imune. Entretanto, o estudo de co-infecção realizado por Yoshida (1999) mostrou que a infecção de camundongo pelo *S. mansoni* não afetou a curso da infecção de *L. major*. As células dos linfonodos desses animais continuaram produzindo INF- γ , importante para ativação dos macrófagos e eliminação do parasito intracelular (YOSHIDA *et al.*, 1999).

Foi observado uma maior frequência de MoDCs infectadas pela *L. braziliensis* nas culturas de 72h nos pacientes com esquistossomose, comparados aos pacientes

com leishmaniose. Não houve diferença entre os dois grupos de pacientes em relação a frequência de MoDCs infectadas após 2h, 24h e 48h e nos números de amastigotas de *Leishmania braziliensis* em 100 MoDCs avaliadas nos diferentes tempos. Macrófagos isolados de camundongos infectados por *S. mansoni*, após serem estimulados com INF- γ falharam quanto a sua capacidade de eliminar *L. major* após infecção *in vitro* (LA FLAMME *et al.*, 2002). Apesar da influência da infecção helmíntica no curso da leishmaniose, foi observado em humanos que o tratamento precoce com anti-helmíntico não melhora o desfecho da lesão, pois não diminui o tempo de cura dessas lesões (NEWLOVE *et al.*, 2011).

Em virtude da regulação observada nas células dendríticas infectadas pela *L. braziliensis* e nos linfócitos de pacientes com esquistossomose este estudo sugere que a co-infecção pode agravar o desfecho clínico da leishmaniose por impedir uma resposta Th1 efetora induzida contra o protozoário.

6.5 CONCLUSÃO

As MoDCs de indivíduos com esquistossomose são mais susceptíveis a infecção por *L. braziliensis*, possivelmente por apresentarem um menor grau de ativação e um perfil regulatório.

CONFLITOS DE INTERESSES

Os participantes desse referido estudo não apresentaram conflitos de interesses.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos pacientes de Corte de Pedra e aos pacientes do Conde por participarem do estudo. A todas as equipes de profissionais que atuam nessas áreas endêmicas por sua dedicação nos trabalhos clínicos do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Actor, J. K., M. Shirai, *et al.* Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.3, Feb 1, p.948-52. 1993.

Agrawal, S., A. Agrawal, *et al.* Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. J Immunol, v.171, n.10, Nov 15, p.4984-9. 2003.

Ameen, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. Clin Exp Dermatol, v.35, n.7, Oct, p.699-705. 2010.

Antonelli, L. R., W. O. Dutra, *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. Immunol Lett, v.101, n.2, Nov 15, p.226-30. 2005.

Araujo, M. I., B. Hoppe, *et al.* Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. J Infect Dis, v.190, n.10, Nov 15, p.1797-803. 2004.

Araujo, M. I., B. S. Hoppe, *et al.* *Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.99, n.5 Suppl 1, p.27-32. 2004.

Azeredo-Coutinho, R.B., M. I. Pimentel, *et al.* Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. Acta Trop., v.154, p.42-9. 2016.

Bacci, A., C. Montagnoli, *et al.* Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. J Immunol, v.168, n.6, Mar 15, p.2904-13. 2002.

Bafica, A. M., L. S. Cardoso, *et al.* Changes in T-Cell and Monocyte Phenotypes In Vitro by *Schistosoma mansoni* Antigens in Cutaneous Leishmaniasis Patients. J Parasitol Res, v.2012, p.520308. 2012.

_____. *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response in vitro during cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.106, n.7, Nov, p.856-63. 2011.

Baratta-Masini, A., A. Teixeira-Carvalho, *et al.* Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. Front Biosci, v.12, p.839-49. 2007.

Barral-Netto, M., A. Barral, *et al.* Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. Science, v.257, n.5069, p.545-8. 1992.

Bennett, S. R., F. R. Carbone, *et al.* Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. Nature, v.393, n.6684, Jun 4, p.478-80. 1998.

Butterworth, A. E., D. W. Dunne, *et al.* Immunity and morbidity in *Schistosoma mansoni* infection: quantitative aspects. Am J Trop Med Hyg, v.55, n.5 Suppl, p.109-15. 1996.

Carvalho, E. M., A. Barral, *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta Trop, v.56, n.4, p.315-25. 1994.

Carvalho, L. P., E. J. Pearce, *et al.* Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high levels of TNF-alpha, whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell responses. J Immunol, v.181, n.9, Nov 1, p.6473-80. 2008.

Cella, M., D. Scheidegger, *et al.* Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. J Exp Med, v.184, n.2, Aug 1, p.747-52. 1996.

Cooke, A., P. Tonks, *et al.* Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. Parasite Immunol, v.21, n.4, p.169-76. 1999.

Corinti, S., C. Albanesi, *et al.* Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. J Immunol, v.166, n.7, Apr 01, p.4312-8. 2001.

D'ostiani, C. F., G. Del Sero, *et al.* Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. J Exp Med, v.191, n.10, May 15, p.1661-74. 2000.

Da-Cruz, A. M., R. Bittar, *et al.* T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. Clin Diagn Lab Immunol, v.9, n.2, Mar, p.251-6. 2002.

De Saint-Vis, B., I. Fugier-Vivier, *et al.* The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. J Immunol, v.160, n.4, Feb 15, p.1666-76. 1998.

Dorcas S. Yole, K. T. S., Kiio Kithome, Michael M. Gicheru. Studies on the interaction of *Schistosoma mansoni* and *Leishmania major* in experimentally infected Balb/c mice. African Journal of Health Sciences v.14, n.1-2. 2007.

Dunne, D. W. and Cooke, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. Nat. Rev. Immunol. v.5, n.5, May, p. 420-6. 2005.

Elliott, D. E., R. W. Summers, *et al.* Helminths as governors of immune-mediated inflammation. Int J Parasitol, v.37, n.5, Apr, p.457-64. 2007.

Elrefaei, M., N. El-Sheikh, *et al.* HCV-specific CD27- CD28- memory T cells are depleted in hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni* co-infection. Immunology, v.110, n.4, Dec, p.513-8. 2003.

Everts, B., A. A. Adegnik, *et al.* Functional impairment of human myeloid dendritic cells during *Schistosoma haematobium* infection. PLoS Negl Trop Dis, v.4, n.4, p.e667. 2010.

Hernandez, H. J., A. H. Sharpe, *et al.* Experimental murine schistosomiasis in the absence of B7 costimulatory molecules: reversal of elicited T cell cytokine profile and partial inhibition of egg granuloma formation. J Immunol, v.162, n.5, Mar 1, p.2884-9. 1999.

Jankovic, D., M. C. Kullberg, *et al.* Parasite-induced Th2 polarization is associated with down-regulated dendritic cell responsiveness to Th1 stimuli and a transient delay in T lymphocyte cycling. J Immunol, v.173, n.4, Aug 15, p.2419-27. 2004.

Katz, N., P. M. Coelho, *et al.* Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. J. Parasitol.,v.56, n.5, p.1032-3. 1970.

Khayeka-Wandabwa, C., H. Kutima, *et al.* Combination therapy using Pentostam and Praziquantel improves lesion healing and parasite resolution in BALB/c mice co-infected with *Leishmania major* and *Schistosoma mansoni*. Parasit Vectors, v.6, p.244. 2013.

King, C. L., A. Medhat, *et al.* Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. J Immunol, v.156, n.12, Jun 15, p.4715-21. 1996.

La Flamme, A. C., P. Scott, *et al.* Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. Parasite Immunol, v.24, n.7, Jul, p.339-45. 2002.

Lima, L. M., S. B. Santos, *et al.* *Schistosoma* antigens downmodulate the in vitro inflammatory response in individuals infected with human T cell lymphotropic virus type 1. Neuroimmunomodulation, v.20, n.4, p.233-8. 2013.

Lopes, D. M., J. S. Fernandes, *et al.* Dendritic cell profile induced by *Schistosoma mansoni* antigen in cutaneous leishmaniasis patients. Biomed Res Int, v.2014, p.743069. 2014.

Louzir, H. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. The Journal of Infectious Diseases, v.177, p.1687-1695. 1998.

Macdonald, A. S., E. A. Patton, *et al.* Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction. J Immunol, v.168, n.9, May 1, p.4643-9. 2002.

Macdonald, A. S., A. D. Straw, *et al.* CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. J Immunol, v.167, n.4, Aug 15, p.1982-8. 2001.

_____. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. J Immunol, v.168, n.2, Jan 15, p.537-40. 2002.

Marple, A., W. Wu, *et al.* Cutting Edge: Helminth Coinfection Blocks Effector Differentiation of CD8 T Cells through Alternate Host Th2- and IL-10-Mediated Responses. J Immunol, v.198, n.2, Jan 15, p.634-639. 2017.

Matos, G. I., J. Covas Cde, *et al.* IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN-gamma production. BMC Infect Dis, v.7, p.33. 2007.

Mcguirk, P., C. Mccann, *et al.* Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. J Exp Med, v.195, n.2, Jan 21, p.221-31. 2002.

Mckee, A. S., F. Dzierszinski, *et al.* Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. J Immunol, v.173, n.4, Aug 15, p.2632-40. 2004.

Medeiros, M., Jr., J. P. Figueiredo, *et al.* *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. J Allergy Clin Immunol, v.111, n.5, May, p.947-51. 2003.

Moser, M. e K. M. Murphy. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. Nat Immunol, v.1, n.3, Sep, p.199-205. 2000.

Nausch, N., D. Louis, *et al.* Age-related patterns in human myeloid dendritic cell populations in people exposed to *Schistosoma haematobium* infection. PLoS Negl Trop Dis, v.6, n.9, p.e1824. 2012.

Newlove, T. Guimaraes, L. H., Antihelminthic therapy and antimony in cutaneous leishmaniasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients co-infected with helminths and *Leishmania braziliensis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. v.84, n.4, Apr, p.551-5. 2011.

O'neal, S. E., L. H. Guimaraes, *et al.* Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis, v.195, n.1, Jan 1, p.142-8. 2007.

Pearce, E. J., P. Caspar, *et al.* Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. J Exp Med, v.173, n.1, p.159-66. 1991.

Pearce, E. J. e A. S. Macdonald. The immunobiology of schistosomiasis. Nat Rev Immunol, v.2, n.7, Jul, p.499-511. 2002.

Porto, A. F., S. B. Santos, *et al.* Helminthic infection down-regulates type 1 immune responses in human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) carriers and is more prevalent in HTLV-1 carriers than in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Infect Dis, v.191, n.4, Feb 15, p.612-8. 2005.

Reis, E. A., T. M. Azevedo, *et al.* Naive donor responses to *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens. Scand J Immunol, v.66, n.6, Dec, p.662-70. 2007.

reviewed Suciú-Foca, N., Manavalan, J. S., *et al.*, Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. Int. Immunopharmacol., v.5, n.1, p.7-11. 2005.

Ribeiro-De-Jesus, A., R. P. Almeida, *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. Braz J Med Biol Res, v.31, n.1, p.143-8. 1998.

Ridge, J. P., F. Di Rosa, *et al.* A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. Nature, v.393, n.6684, Jun 4, p.474-8. 1998.

Roberts, M. T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. Br Med Bull, v.75-76, p.115-30. 2005.

Rutitzky, L. I., E. Ozkaynak, *et al.* Disruption of the ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway leads to enhanced hepatic immunopathology and increased gamma interferon production by CD4 T cells in murine schistosomiasis. Infect Immun, v.71, n.7, Jul, p.4040-4. 2003.

Sabin, E. A., M. I. Araujo, *et al.* Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. J Infect Dis, v.173, n.1, p.269-72. 1996.

Straw, A. D., A. S. Macdonald, *et al.* CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. J Immunol, v.170, n.2, Jan 15, p.727-34. 2003.

Subramanian, G., J. W. Kazura, *et al.* B7-2 requirement for helminth-induced granuloma formation and CD4 type 2 T helper cell cytokine expression. J Immunol, v.158, n.12, Jun 15, p.5914-20. 1997.

Sun, X. J., R. Li, *et al.* Unique roles of *Schistosoma japonicum* protein Sj16 to induce IFN-gamma and IL-10 producing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in vitro and in vivo. Parasite Immunol, v.34, n.8-9, Aug-Sep, p.430-9. 2012.

Taylor, M. D., L. Legoff, *et al.* Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. J Immunol, v.174, n.8, Apr 15, p.4924-33. 2005.

Trottein, F., N. Pavelka, *et al.* A type I IFN-dependent pathway induced by *Schistosoma mansoni* eggs in mouse myeloid dendritic cells generates an inflammatory signature. J Immunol, v.172, n.5, Mar 1, p.3011-7. 2004.

Vouldoukis, I., P. A. Becherel, *et al.* Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. Eur J Immunol, v.27, n.4, Apr, p.860-5. 1997.

Wang, M. L., Y. M. Cao, *et al.* Pre-existing *Schistosoma japonicum* infection alters the immune response to *Plasmodium berghei* infection in C57BL/6 mice. Malar J, v.12, Sep 14, p.322. 2013.

Yamazaki, S., T. Iyoda, *et al.* Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. J Exp Med, v.198, n.2, Jul 21, p.235-47. 2003.

Yoshida, A., H. Maruyama, *et al.* Immune response against protozoal and nematodal infection in mice with underlying *Schistosoma mansoni* infection. Parasitol Int, v.48, n.1, Mar, p.73-9. 1999.

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

7 CAPÍTULO 3: Manuscrito 3: Revisão: Aspectos imunopatogênicos e diagnósticos na leishmaniose tegumentar americana

Diego Mota Lopes^{1,2}, Luís Eduardo Ribeiro^{1,2}, Luciana Santos Cardoso^{1,3,4}

¹Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia. ²Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT –DT/CNPq), Salvador, Bahia, Brasil. ⁴Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFBA.

+ Autor para correspondência: Luciana Santos Cardoso. Serviço de Imunologia, HUPES, UFBA. Rua João das Botas, S/N, 5º. andar. Canela, Salvador-Bahia, Brazil. CEP 40110.160. Fone: 55-71-3237-7353. FAX: 55-71-3245-7110. e-mail: lucianac@ufba.br

RESUMO

A *Leishmania* é um parasito intracelular que causa um amplo espectro de doenças no homem, variando desde lesões cutâneas localizadas até as formas viscerais. A resposta imune predominante na infecção por este parasito é do tipo Th1, que é importante para ativação dos macrófagos e eliminação da *Leishmania*, mas também é a principal responsável pela patogênese da doença tegumentar, principalmente no que se refere à lesão tecidual. O diagnóstico da leishmaniose tegumentar engloba aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais com a pesquisa do parasito e/ou testes imunológicos. A forte associação entre a resposta imune do hospedeiro e a patogenia da infecção por *Leishmania* faz com que a modulação da resposta imune seja uma das estratégias mais estudadas para a terapêutica e a prevenção da leishmaniose. Portanto o objetivo deste artigo é abordar os aspectos imunopatogênicos e laboratoriais atuais da leishmaniose tegumentar americana.

Palavras-chave: Leishmaniose, Imunopatogênese, Diagnóstico Laboratorial, Terapêutica

ABSTRACT

The intracellular parasite is a *Leishmania* causing a wide spectrum of diseases in humans ranging from skin lesions localized to the visceral forms. The immune response to this parasite is the th1 type, which is important for activation of macrophages and elimination of *Leishmania*, but also is mainly responsible for the pathogenesis of cutaneous disease, especially with regard to tissue injury. The diagnosis of cutaneous leishmaniasis involves clinical, epidemiological and laboratory research of the parasite and/or immunological tests. The strong association between the host immune response and pathogenesis of *Leishmania* infection causes modulation of the immune response is one of the most studied strategies for the therapy and prevention of leishmaniasis. Therefore, the aim of this paper is to address the current laboratory and immunopathogenic aspects of american cutaneous leishmaniasis.

Key words: Leishmaniasis, Immunopathogenesis, Laboratory Diagnosis, Therapy

7.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar (LTA) é uma doença com ampla distribuição geográfica. Aproximadamente, 95% dos casos ocorrem nas regiões endêmicas das Américas do Sul e Central, África, Ásia e Oriente Médio (WHO, 2017). A LT é causada por uma variedade de espécies de *Leishmania* transmitidas pela picada de flebotomíneos infectados. Cerca de 90 países de clima tropical e sub-tropical são afetados pela leishmaniose, sendo somente em 32 desses países a doença considerada de notificação compulsória (GONTIJO E DE CARVALHO, 2003; WHO, 2017). No mundo estima-se uma incidência de 0,7-1,3 milhões de novos casos de LT anualmente (WHO, 2017). No Brasil, em 2015 foram registrados mais 19 mil casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo as regiões Norte e Nordeste as áreas endêmicas de maior prevalência (BRASIL, 2017). A Bahia apresenta uma elevada incidência de leishmaniose (22/100.000 hab.) com mais de 2mil casos registrados em 2015, sendo transmitida principalmente pela espécie *Leishmania braziliensis*, parasito intracelular que causa um amplo espectro de doenças no homem, variando desde lesões cutâneas localizadas à formas disseminadas (BRASIL, 2017). Esta doença vem mostrando um crescimento alarmante, especialmente nas áreas peri-urbanas (WHO, 2017).

A *Leishmania* é um parasito intracelular que causa um amplo espectro de doenças no homem, variando desde lesões cutâneas localizadas, na leishmaniose tegumentar americana (LTA), até as formas viscerais. Dentre essas diferentes formas clínicas, cerca de 10% dos indivíduos residentes em áreas endêmicas apresentam teste de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania* positivo e não desenvolvem a doença, caracterizando uma forma subclínica (BADARO *et al.*, 1986; DAVIES *et al.*, 1995). A LTA apresenta-se clinicamente sobre quatro formas distintas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose disseminada (LD), causadas principalmente pela *L. braziliensis* e leishmaniose cutânea difusa (LCD) causada principalmente *L. amazonensis* (MARSDEN *et al.*, 1990c; a; b; YURDAKUL *et al.*, 2005).

É bem documentado que as diferentes manifestações clínicas da doença estão relacionadas a fatores intrínsecos do parasito, a exemplo do tipo *Leishmania* e

virulência, mas também fatores relacionados a resposta imune do hospedeiro. A leishmaniose cutânea localizada (LC) representa cerca de 90 a 95% dos casos de LTA (JONES *et al.*, 1987). Caracteriza-se, clinicamente, por uma úlcera cutânea bem delimitada com bordas elevadas, com um fundo geralmente granuloso (JONES *et al.*, 1987). A lesão cutânea localizada se instala no sítio de entrada do parasito após período de incubação estimado de uma a duas semanas (GONZALEZ *et al.*, 2009). Além de ter alta incidência e uma ampla distribuição geográfica, a LTA é responsável pelo desenvolvimento de forma clínica crônica, a leishmaniose mucosa (LM), que gera lesões desfigurantes e que promovem a incapacitação do indivíduo infectado (GONTIJO E DE CARVALHO, 2003). Aproximadamente 3% dos pacientes com LC desenvolvem a doença mucosa que afeta principalmente a região naso-faríngea, concomitantemente ou meses após o aparecimento da úlcera cutânea (JONES *et al.*, 1987).

Os métodos diagnósticos que são mais utilizados atualmente baseiam-se na pesquisa indireta do parasito, a exemplo dos métodos sorológicos. Estes métodos apresentam desvantagens operacionais nas áreas endêmicas, devido a falta de infraestrutura, e uma baixa sensibilidade. Devido a isso, faz-se necessário a busca por métodos moleculares que são mais sensíveis e específicos. O objetivo dessa revisão é atualizar-se sobre a imunopatogênese da leishmaniose tegumentar e os métodos laboratoriais utilizados para seu diagnóstico.

7.1.1 RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO PELA *LEISHMANIA SP.*

A transmissão da leishmaniose se dá pela picada da fêmea de flebotomíneo infectada, que inocula na pele do hospedeiro formas promastigotas metacíclicas infectantes, suspensas na saliva do flebotomíneo (TITUS E RIBEIRO, 1988)

A inoculação das formas promastigotas metacíclicas induz o recrutamento de células de defesa do hospedeiro, tais como macrófagos/monócitos, células NK e polimorfonucleares neutrófilos (PMN), bem como a liberação de fatores solúveis como a proteína C reativa (PCR) e fatores do sistema complemento (SOLBACH E LASKAY, 2000). As promastigotas metacíclicas liberam um fator quimiotático para PMN, os quais são as primeiras células a chegarem ao sítio da infecção (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2002).

Os neutrófilos são estimulados pela *Leishmania* a produzirem quimiocinas que atuarão no recrutamento de monócitos/macrófagos, células dendríticas imaturas e linfócitos T (MULLER *et al.*, 2001).

Após serem inoculados na pele e durante o processo de migração através da matriz extracelular (DE SMEDT *et al.* 1997), as formas promastigotas metacíclicas podem ser fagocitadas por macrófagos residentes na pele, células dendríticas teciduais (Langerhans) e por monócitos circulantes (SALAIZA-SUAZO *et al.*, 1999). As células de Langerhans, funcionam, inicialmente, com um “habitat seguro” para a *Leishmania* em função da deficiência de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS, NOS-2), que não permite que essas células produzam Óxido Nítrico (NO) para eliminação do parasito (BOGDAN *et al.*, 1996; CUNNINGHAM, 2002; MOLL *et al.*, 2002). Ainda no início da infecção, as células dendríticas da pele transportam o parasito do sítio da infecção na pele aos linfonodos regionais de drenagem. Durante esta migração, se diferenciam em células dendríticas maduras com potentes funções apresentadoras de antígeno e capacidade de ativar células T. As células dendríticas produzem IL-12 que atuam sobre as células NK, e os linfócitos T induzindo-as a produzirem IFN- γ , citocina responsável pela ativação de mecanismos microbicidas de macrófagos (MURRAY *et al.*, 1985; TRINCHIERI *et al.*, 1995).

Embora as formas promastigotas possam infectar as células de Langerhans da pele os PMN e os macrófagos são as principais células hospedeiras para a *Leishmania*. A *Leishmania* penetra nos macrófagos através de endocitose mediada por receptores, dentre os quais os mais importantes são os do complemento CR1 e

CR3. A opsonização com C_{3b} e C_{3bi} ocorre pela ligação aos receptores CR1 e CR3, respectivamente, e sua importância consiste na mediação da fagocitose sem ativação da cascata oxidativa, que é danosa ao parasito. Outro benefício para o parasito pela interação via receptor CR3 é que essa interação inibe a imunidade celular induzida por IL-12. As moléculas de lipofosfoglicano (LPG) e a gp63 também estão envolvidas na invasão dos macrófagos através da ligação com receptores CR1, CR3 e o sítio lectina-símile e CR3 e o da fibronectina, respectivamente (CUNNINGHAM, 2002; HANDMAN E BULLEN, 2002)

Outros receptores, como o da manose-fucose, o CR4 e o da proteína C reativa também auxiliam a fagocitose das promastigotas pelos macrófagos do hospedeiro (HANDMAN E BULLEN, 2002). Adicionalmente, as promastigotas interagem com outras proteínas séricas para ativar o complemento, facilitando, então, sua fagocitose pelos macrófagos do hospedeiro (CUNNINGHAM, 2002).

Após a ligação aos macrófagos, as promastigotas sofrem endocitose para o fagossomo, que posteriormente, pela fusão com o lisossomo, se transforma em fagolisossomo - um compartimento ácido rico em peptídeos microbicidas e enzimas hidrolíticas (CUNNINGHAM, 2002; HANDMAN E BULLEN, 2002). Antígenos da *Leishmania*, a exemplo do LPG estão relacionados a inibição da ativação dos mecanismos oxidativos e de vias de transdução de sinal, favorecendo a sobrevivência do parasito nos fagócitos (HANDMAN E BULLEN, 2002).

Ao sobreviverem aos mecanismos de eliminação do hospedeiro, as formas amastigotas, se multiplicam por divisão binária e causam, eventualmente, a lise dos macrófagos infectados. Assim, as amastigotas são liberadas e podem infectar células dendríticas e macrófagos vizinhos, recomeçando o ciclo (CUNNINGHAM, 2002).

7.1.2 IMUNOPATOGENESE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Do ponto de vista histopatológico as lesões de LC e LM são caracterizadas por um processo inflamatório com linfócitos e plasmócitos e com raros ou até mesma ausência de parasitos (BITTENCOURT E BARRAL, 1991). Todavia nas formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar, a despeito de existir uma resposta imune do tipo Th1 protetora, os pacientes evoluem para a doença.

A resposta imune exacerbada parece ser a principal causa da lesão tecidual da leishmaniose tegumentar, uma vez que os pacientes com LC e LM produzem níveis altos de IFN- γ e TNF existindo uma associação entre produção de IFN- γ e TNF e tamanho da lesão assim como o aparecimento de formas mais graves da doença (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; ANTONELLI *et al.*, 2005). Além disso, indivíduos com LC sub-clínica, isto é, com teste sorológico ecutâneo positivo, mas que não apresentam lesões na pele, apresentam menores níveis de IFN- γ frente à exposição a antígenos de *Leishmania* em relação os pacientes sintomáticos (FOLLADOR *et al.*, 2002).

Desse modo mecanismos imunológicos na leishmaniose levam à destruição celular e tecidual, culminando com o aparecimento da úlcera leishmaniótica que é a manifestação clínica mais importante na LTA. A resposta imune exacerbada do tipo Th1, ao mesmo tempo que é importante para ativação dos macrófagos e eliminação da *Leishmania* é a principal responsável pela patogênese da doença, principalmente no que se refere à lesão tecidual (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; BACELLAR *et al.*, 2002).

Estudo realizado por Bacellar e cols. mostrou que as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LM e LC quando estimuladas com antígeno de *L. braziliensis in vitro* produzem pouco ou não produzem IL-10 (BACELLAR *et al.*, 2002).

O equilíbrio da resposta imunológica observada nos indivíduos subclínicos ainda não está totalmente esclarecido. Porém a resposta desses indivíduos é eficiente para controlar a parasitemia e equilibrada o suficiente para não desenvolver a lesão. Apesar de haver uma baixa produção de IFN- γ por indivíduos SC quando comparado com indivíduos com LC, Muniz e cols. mostrou que esses indivíduos apresentam maior frequência de células NK expressando IFN- γ em relação aos pacientes com

LC e que a população de linfócitos T CD4 e CD8 dos indivíduos subclínicos expressam menos INF- γ comparados aos dos indivíduos com LC (MUNIZ *et al.*, 2016). Como as células NK fazem parte da resposta imune inata, acredita-se que a produção de IFN- γ por essas células no início da infecção pode estar relacionada com o controle da multiplicação dos parasitos, o que impediria o desenvolvimento de LC. Este estudo sugere ainda que no início da infecção, o IFN- γ está relacionado à proteção, enquanto que na fase final está associado ao desenvolvimento da lesão (MUNIZ *et al.*, 2016).

Estudos com macrófagos derivados de monócitos de indivíduos com infecção subclínica mostraram que estas células também são menos permissivas à penetração pela *Leishmania* e mais eficientes na eliminação intracelular do parasito comparada as células de pacientes com LC (BOSQUE *et al.*, 2000; GIUDICE *et al.*, 2012). Estudo recente publicado por Muniz e cols. mostrando que assim como os macrófagos, os monócitos de indivíduos SC são menos permissivos e eliminam a *Leishmania in vitro* mais eficientemente em relação aos dos indivíduos LC (MUNIZ *et al.*, 2016).

7.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O Diagnóstico preciso e precoce da LT é importante para o tratamento adequado e o controle das possíveis complicações da doença. O diagnóstico da LT engloba aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais com a pesquisa do parasito e/ou testes imunológicos.

A suspeita clínica de LT é sugerida na anamnese e baseia-se nas características da lesão associada aos dados epidemiológicos do paciente.

O período de incubação varia de 2 a 3 semanas até 2 meses ou mais. As lesões surgem no local da picada do inseto e, portanto, localizam-se em áreas expostas.

A lesão ulcerada apresenta bordas elevadas bem características, base granulosa que sangra facilmente e o tamanho podem variar de 3 a 12 cm. O paciente pode apresentar lesões únicas ou múltiplas. As que não ulceram também aumentam e tornam-se nodulares ou verrucosas. As lesões cutâneas tendem à cicatrização espontânea, exceto as do pavilhão auricular, no período de até três meses.

Em aproximadamente 1/3 dos casos de leishmaniose tegumentar ocorre o comprometimento da mucosa através de disseminação do parasito por via sanguínea ou linfática e exteriorizando-se a lesão 3 a 10 anos mais tarde. A lesão pode acometer lábios, faringe, amídalas, assoalho da boca e língua podendo afetar até mesmo a laringe, a traquéia e os brônquios. A mucosa encontra-se espessada, edematosa, sangra facilmente, é dolorosa e tem odor fétido.

7.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose pode ser realizado através do exame direto de esfregaços, da análise histopatológica das lesões, de testes sorológicos ou do teste cutâneo com antígenos de *Leishmania* (Reação de Montenegro) e por biologia molecular (PCR). O diagnóstico definitivo depende da identificação de amastigotas em amostras analisadas à microscopia óptica ou por isolamento e identificação das *Leishmania sp.*

7.3.1 Exame direto do esfregaço

O exame direto é um raspado indolor feito na borda externa ou interna da lesão. O material é avaliado em uma lâmina de esfregaço em microscopia óptica. Embora considerado de baixa sensibilidade, esta técnica é de fácil manipulação e bastante utilizada em áreas com infraestrutura laboratoriais precárias. Melo e cols, (2011) mostrou que a sensibilidade para o raspado na região externa da lesão foi de 42,5% e da região interna 62,5%. Neste estudo a combinação de exames diretos alcançou um valor de sensibilidade de 77,5%, sugerindo que os métodos diretos podem ser utilizados com segurança, principalmente do raspado do interior da lesão, para o diagnóstico de LC (DE MELLO *et al.*, 2011). Apesar da baixa sensibilidade, existe estudo mostrando capacidade de detecção de *Leishmania* por este método em 95% dos indivíduos com resultados positivos para LTA (ARRAES *et al.*, 2008).

7.3.2 Biópsia

A biópsia da lesão deverá ser realizada utilizando lidocaina a 2%, com retirada de pelo menos dois fragmentos que serão utilizados para esfregaço em lâmina que deve ser corada por Giemsa ou Leishman, e outro para ser fixado em formol para estudo histopatológico, que deve revelar granuloma linfo-histiocitário e células epitelióides com *Leishmania*.

Nas lesões recentes, com menos de 30 dias de evolução, pode haver um maior número de parasitos que diminui com o aumento da duração das lesões (ROMERO *et al.*, 1999). Pela histopatologia convencional na coloração pela hematoxilina e eosina (HE), os parasitos podem ser encontrados em menos da metade dos casos examinados. Os parasitos são encontrados em vacúolos no interior de macrófagos ou no espaço extracelular. Formas amastigotas de *Leishmania* podem ser encontradas em células epitelióides e ou macrófagos multinucleados nos granulomas (BOGGILD *et al.* 2010). No caso da LTA, a sensibilidade da observação do parasito no raspado tecidual depende da forma clínica da qual se obtem as amostras de tecido. Outro aspecto importante é a influencia da idade, sexo e tipo de lesão (BARRIO *et al.*, 2007). Já as lesões mucosas apresentam uma escassez no número de amastigotas, o que determina uma sensibilidade diagnóstica de baixo valor preditivo (WEIGLE *et al.*, 1987).

7.3.3 Culturas de *Leishmania sp.*

A cultura dos promastigotas *in vitro* permite a identificação da espécie presente na lesão. Entretanto, as espécies de *Leishmania* apresentam capacidade de crescimento variável em cultura e esse método requer uma série de condições laboratoriais, pessoal treinado e mais de 10 dias para a aquisição de um número suficiente de promastigotas para as investigações. As *Leishmanias* isoladas de lesão de pele de paciente com leishmaniose inicialmente deve ser cultivada em meio bifasico Novy MacNeal e Nicolle (NNN-Ágar sangue modificado), LIT (Liver Infusion Triptose) ou Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) á 23°C para permitir o crescimento parasitário. Depois de cinco dias de cultivo já podem ser encontradas formas promastigotas do parasito, porém se ainda não houver crescimento, a cultura deve ser mantida até um mês. Em seguida devem ser

cultivadas á 23°C em meio Schneider suplementado segundo o fabricante, permitindo a multiplicação do protozoário e crescimento das promastigotas metacíclicas até a fase-estacionária (5-7 dias). Casos crônicos, como aqueles com baixa carga parasitária na lesão, também resultam em uma sensibilidade ainda mais reduzida desse método. Estas características tornam o método de isolamento do parasito em culturas inadequado para o inquérito epidemiológico em larga escala.

7.3.4 Infecção em animais

O diagnóstico parasitológico com a inoculação de material da biópsia cutânea em animais de laboratório, de preferência hamsters (*Mesocricetus auratus*), além do longo tempo necessário para a evolução da lesão no modelo animal (2 a 9 meses em média) e da necessidade de um laboratório adequado, a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania* (VEGA-LOPEZ, 2003). Esse método, na verdade, é mais utilizado em laboratórios de pesquisa.

7.3.5 Teste de Montenegro

Extrato antigênico de *Leishmania sp.* (SLA) obtido a partir de culturas de promastigotas é aplicado na dose de 0,1 ou 0,2 mL por via intradérmica na superfície anterior do antebraço, e a leitura deve ser realizada em 48 a 72h.

A resposta imunologica é caracterizada por uma hipersensibilidade celular tardia, apresentando infiltrados com predominância de linfócitos e macrófagos no local da infecção. A positividade se traduz por pápula com 5mm ou mais de diâmetro. O resultado pode ser negativo nas primeiras semanas após surgimento da lesão cutânea em humanos, podendo também obter resultados falsos positivos quando este teste é repetido com intervalo de poucas semanas. Apresenta-se positivo em 90% dos indivíduos com doença ativa ou pregressa; torna-se positivo a partir do terceiro mês de infecção, assim permanecendo pelo resto da vida (BOGGILD *et al.* 2010).

O teste de Montenegro quando positivo promove uma hipersensibilidade celular tardia, com presença de infiltrados de macrófagos e linfócitos (BARRAL-NETTO *et al.*, 1995). Porém, como o teste é realizado com um coquetel de antígenos (antígenos de diferentes espécies de *Leishmania sp.*) podem ocorrer reações

cruzadas com outras infecções, sendo o teste de baixa especificidade (MEDEIROS *et al.*, 2002).

Em pacientes com LC ou LM infectados pela *L. braziliensis* existe uma forte associação entre a positividade do teste de Montenegro e a produção de IFN- γ , bem como evidência de resposta proliferativa de linfócitos frente ao SLA (DA-CRUZ *et al.*, 2002). Entretanto, pode haver discordâncias entre essas duas avaliações que podem ser devido a presença de factores de supressão *in vivo* que impedem a positividade do teste na pele, a produção ou não de IFN- γ por células não T, a presença ou não de células T efectoras ou de memória, assim como a má nutrição dos indivíduos. A restauração da positividade do teste de Montenegro pode ocorrer após a terapia específica, bem como com a melhora do estado nutricional dos indivíduos (YONEDA *et al.*, 1989).

7.3.6 Teste Imunoenzimático (ELISA)

As reações sorológicas podem ser muito úteis principalmente nos casos com lesões extensas e múltiplas e no diagnóstico precoce das lesões mucosas secundárias ou primárias.

A técnica de ELISA foi rapidamente incorporada como opção diagnóstica tanto para leishmaniose tegumentar quanto visceral. Esta técnica oferece uma maior sensibilidade quanto a detecção de anticorpos específicos contra o parasito da *Leshmania*. Esta vantagem se ilustra melhor quando o exame sorológico compara o poder de discriminação de resposta humoral de pacientes infectados por *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. O método de ELISA demonstrou títulos mais elevados de anticorpos naqueles pacientes infectados por *L. braziliensis*. Uma vantagem importante do método de ELISA é que este permite uma maior especificidade discriminando pacientes com LTA daqueles com Chagas, Malária ou outras enfermidades que apresentem reações cruzadas com títulos baixos (JUNQUEIRA *et al.*, 2003).

Outra razão pela qual ELISA tem um enorme potencial como método diagnóstico é a utilização de frações subcelulares, de novos substratos para a detecção, a substituição de antígenos brutos por proteínas recombinantes, tais como o terminal carboxil da hsp70 de *L. braziliensis*, hsp83 de *L. infantum*, a porção média de

histona H1 de *L. braziliensis*, as proteínas ácidas ribossomais de *L. infantum*, as T26-U2 e T26-U4 de *L. peruviana* (CELESTE *et al.*, 2004; CATALDO *et al.*, 2010).

7.3.7 Técnica de Imunofluorescência indireta (IFI)

A Imunofluorescência indireta é, entre os métodos sorológicos, o mais utilizado. É uma técnica sensível, porém, existe a possibilidade de reações cruzadas contra outros agentes a exemplo do *Trypanosoma cruzi* (doença de chagas) e com a *L. chagasi*, agente da leishmaniose visceral, ambas as doenças prevalentes em áreas endêmicas de LT, causando resultados falsos positivos em termos de diagnósticos (KAR *et al.*, 1995). A sensibilidade do método IFI da forma cutânea isolada é estimada em 71% podendo alcançar 100% na forma mucosa, na qual a resposta imunológica do hospedeiro é intensa (KAR *et al.*, 1995). Os títulos do IFI são influenciados pela espécie do parasito, tipo de lesão e tempo de duração da mesma.

Em pacientes imunossuprimidos ou que apresentam lesões com menos de seis meses de evolução é comum encontrar resultado sorológico negativo. Por outro lado, os pacientes com sorologia positiva, os títulos médios de anticorpos são mais elevados (principalmente IgG) naqueles que apresentam múltiplas lesões, podendo estar relacionado com uma maior imunogenicidade induzida por uma exposição antigênica mais expressiva nestes indivíduos (GONTIJO E DE CARVALHO, 2003). Os títulos podem diminuir ou desaparecer em alguns meses, após o tratamento ou cura.

7.3.8 Citometria de Fluxo

As baixas quantidades de parasitos na lesão dos indivíduos com LTA não tornam o isolamento do parasito, o diagnóstico histopatológico e o uso PCR totalmente confiáveis, levando frequentemente a resultado falso-negativo. A presença de anticorpos contra a *Leishmania* em indivíduos infectados abre novas perspectivas de métodos diagnósticos. A citometria de fluxo (CF) é um método sorológica usando microesferas de poliestireno sensibilizadas com antígenos solúveis de *Leishmania* (1mg/ml) como uma ferramenta para a detecção de anticorpos IgG no soro de pacientes com LC. Teste sorológico por citometria de fluxo pode ser utilizado para confirmar casos em LC em áreas de transmissão pela *L. braziliensis*, no entanto, a

presença da doença de Chagas tem de ser descartada nestes indivíduos (PEDRAL-SAMPAIO *et al.*, 2016). Estudo realizado por Sampaio e cols. mostrou uma maior sensibilidade (S) da técnica de citometria de fluxo em relação ao ELISA, porém uma menor especificidade (E) (PEDRAL-SAMPAIO *et al.*, 2016). A utilização da técnica de CF permitiu a distinção de 95% dos pacientes que apresentavam lesões de LC como grupo de alta reatividade apresentando percentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP > 50%) e 72% dos indivíduos sem lesões como grupo de baixa reatividade (PPFP <50%) (ROCHA *et al.*, 2002). Neste estudo a análise do IFI não apresentou relação com a ausência ou presença de lesão, sugerido os autores a aplicabilidade da citometria de fluxo para identificar casos de infecção ativa (ROCHA *et al.*, 2002). Outro estudo mostrou que o método de citometria de fluxo apresentou maior sensibilidade (86%), porém especificidade baixa (77%) em relação à imunofluorescência indirecta (S:78%; E: 85%, respectivamente) sendo indicado sua aplicabilidade ao estudo da LTA no critério de cura (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

7.3.9 Immunoblotting/Western Blot (WB)

O Immunoblotting ou Western Blot (WB) é um ensaio imunoenzimático realizado sobre a uma superfície de membrana podendo detectar baixos níveis de anticorpo. É utilizado para identificar reatividade específica entre anticorpos e antígenos de *Leishmania* (reviewed PORFIRIO-PASSOS *et al.*, 2012). Em estudo realizado por Brito e cols (2000), a técnica de WB apresentou sensibilidade (S) e especificidade (E) superiores ao ensaio imunoenzimático e ao teste de imunofluorescência indirecta (S= 90,9% e E= 100%) (BRITO *et al.*, 2000). No entanto, Szargiki e cols. (2009), apresentaram um estudo onde a sensibilidade do WB foi 100% em relação ao ELISA e IFI, sugerindo a importancia de sua utilização principalmente tanto em portadores assintomáticos quanto para diferenciar a infecção pela *Leishmania* de outros protozoários, a exemplo de *Trypanosoma* e *Toxoplasma*, responsáveis por reações cruzadas (SZARGIKI *et al.*, 2009).

7.3.10 PCR e PCR em tempo real no Diagnóstico da LT

Diversos ensaios de Reação de Polimerases em Cadeia (PCR) foram desenvolvidos para a detecção de espécies de *Leishmania sp.* em amostras clínicas (CASTILHO *et al.*, 2003). Este método tem como objetivo a amplificação de genes do RNA ribossomal, de genes de mini exon, de DNA do cinetoplasto e de sequências de DNA repetitivo. Podendo assim identificar não só o parasito como também a espécie presente na amostra.

A necessidade da confirmação parasitológica diante da possibilidade do tratamento clínico torna o PCR uma técnica muito útil na identificação da LT. Estudos prévios têm mostrado uma escassez ou até mesmo ausência de parasitos nas lesões de pacientes com LT, tornando assim o diagnóstico parasitológico ainda mais difícil e podendo levar a atraso no início do tratamento. Estudos realizados em 2003 demonstraram que a PCR foi positiva em 100% das biópsias de pele obtidas de pacientes com LT (DE OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A principal vantagem do PCR em Tem Real (qPCR) é sua maior automação, o que resulta em economia de tempo (FRANCINO *et al.*, 2006; BEN ABDA *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2014). Além disso, o uso de qPCR como método diagnóstico é altamente positivo pelo fato de ser uma técnica com alta especificidade (GOMES *et al.*, 2016), o que é essencial, particularmente para LM, em que é esperada uma baixa quantidade parasitária (BOGGILD *et al.*, 2011; BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012). Estudo recente observou que o desempenho de qPCR foi superior ao da maioria das outras técnicas usadas para a detecção de *Leishmania* e que a coleta da amostra de forma não invasiva (swab) pode atingir uma precisão semelhante à da biopsia (GOMES *et al.*, 2016). No entanto, o qPCR não é suficientemente preciso para ser usado como uma técnica única porque a sua sensibilidade é inferior a 100%, sendo a inclusão de dados clínicos e o Teste de Montenegro necessários em casos que o qPCR apresenta resultados negativos (GOMES *et al.*, 2016). A utilização do PCR quando usados duas técnicas de amplificação (mini-exon and HSP-70) aumenta a capacidade de detecção de infecção em aproximadamente 90% (BENICIO *et al.*, 2011). Adicionalmente a combinação da utilização do PCR com histopatologia, pode apresentar sensibilidade alta de 94% (BENICIO *et al.*, 2011).

Estudo realizado por Weirather (2011) utilizando qPCR apresentou boa sensibilidade para detectar baixos níveis de parasitos e distinguir entre as espécies de *Leishmania* em amostras humanas, bem como determinar a carga parasitária possibilitando a avaliação da resposta pós-tratamento nos pacientes infectados (WEIRATHER *et al.*, 2011).

A realização do diagnóstico da LC por biologia molecular traz inúmeras vantagens ao auxílio do combate a essa doença. É conhecido que a genética humana e parasitária influencia no curso da leishmaniose. Como revisado por Schriefer e cols. (2008), diferentes cepas de *Leishmania sp* levam a diversos quadros clínicos e respostas ao tratamento. Portanto, a identificação genética do parasito, principalmente a detecção de cepas virulentas ou resistentes auxiliará no diagnóstico preditivo dos destinos clínicos e terapêuticos dos indivíduos infectados (SCHRIEFER *et al.*, 2008).

7.4 TRATAMENTO

Até o momento não existe uma vacina eficaz contra a leishmaniose. Os testes para vacinação em humanos utilizando-se proteínas recombinantes ou parasitos mortos apresentaram até o momento uma imunidade protetora a curto prazo (GOMES-SILVA *et al.*, 2007; CHAMAKH-AYARI *et al.*, 2014). Poucos avanços foram feitos no tratamento destas doenças nos últimos anos. O antimonial pentavalente (Sb^v) durante muito tempo era o tratamento padrão adotado mundialmente para leishmaniose, porém devido a elevadas taxas de insucesso, toxicidade e surgimento de resistência na leishmaniose tegumentar sua utilização vem sendo questionada (LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2008).

7.4.1 Tratamento Farmacológico

O tratamento com o antimonial pentavalente (Sb^V) preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), recomenda que a dose seja calculada em $mg/Sb^V/Kg/dia$. Na forma cutânea a dose é de $15mg Sb^V/kg/dia$ durante 20 a 30 dias seguidos, e na forma cutâneo-mucosa, $20mg Sb^V/kg/dia$ durante 30 dias seguidos ou até cura clínica.

Antes e durante o tratamento, semanalmente, é necessário o controle de transaminases, bilirrubinas, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, leucograma e eletrocardiograma para avaliar a toxicidade hepática, renal e cardíaca.

Anfotericina B é a droga de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial. A dose total cumulativa é de 1-1,5g para a forma cutânea, e de 2,5-3g para a cutâneo-mucosa, o que equivale a 30-50mg/kg.

Pentamidina é um composto diamidínico que age na glicólise aeróbia e anaeróbia do metabolismo do protozoário. Tem sido usado com êxito na leishmaniose cutânea, entretanto a poucos relatos de seu uso na forma mucosa. Pode-se constituir alternativa nos casos que não respondem aos antimoniais pentavalentes. A dose é de $4mg/kg/dia$ intramuscular de 2/2 dias até atingir dose total de 720mg com bons resultados terapêuticos.

As reações mais frequentes são dor, induração, abscessos no local de aplicação, náusea, tontura, adinamia, mialgia, cefaléia, hipotensão, hiperglicemia, hipoglicemia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e alterações eletrocardiográficas. Seu uso é contraindicado em pacientes com hepatopatia, nefropatia, *diabetes mellitus* e cardiopatia.

O controle da cura se dá principalmente pela observação de três aspectos: regressão total das lesões no fim do tratamento ou até um mês após o termino do mesmo; não recidiva das lesões por 5 anos após o tratamento; diminuição dos títulos de anticorpos nos primeiros meses ou até a negativação destes após o primeiro ano de tratamento (forma cutânea) e após o primeiro ou segundo ano de tratamento da forma mucosa.

7.4.2 Imunoterapia na LTA

A forte associação entre a resposta imune do hospedeiro e a patogenia da infecção por *Leishmania* faz com que a modulação da resposta imune seja uma das estratégias mais estudadas para o controle e a prevenção da leishmaniose.

A falência terapêutica observada com o antimonial em todas as formas clínicas de leishmaniose e as reações adversas relacionadas a dose e duração do tratamento apontam para a necessidade de novas estratégias para o tratamento dessa doença. As observações de que a imunoterapia adjuvante, além de diminuir o tempo de cicatrização das lesões, é efetiva para o tratamento de formas resistentes tornam essa perspectiva terapêutica a mais promissora atualmente (AREVALO *et al.*, 2001).

Embora a maioria dos pacientes sejam curados com o uso de antimonial pentavalente (Sb^V), a necessidade de usar doses elevadas e por um longo período de tempo (30 dias) muitas vezes resulta no aparecimento de toxicidade, que pode impedir a manutenção da droga. Adicionalmente, muitos pacientes podem precisar de nova série de tratamento, aumentando a incidência de efeitos colaterais e o custo do tratamento. Falha terapêutica tem sido relatada em até 37% dos casos (SAENZ *et al.*, 1991), enquanto um estudo realizado em Corte de Pedra/BA documentou que 17% dos pacientes com LTA, causada por *L. braziliensis*, tratados com Sb^V , apresentam recidiva em períodos variáveis de tempo (NETTO *et al.*, 1990). Diversos efeitos colaterais têm sido associados ao uso de Sb^V , incluindo atralgia, mialgia, dor abdominal, náuseas, cefaléia, cardiotoxicidade, elevação de enzimas hepáticas e de enzimas pancreáticas. A anfotericina B é a melhor opção para os pacientes com LM não responsiva a antimonial pentavalente, porém seu emprego requer hospitalização e sua utilização é limitada pela toxicidade (MARSDEN *et al.*, 1994).

Associação de alguns imunomoduladores com a terapia clássica tem sido estimulada, no sentido de diminuir o tempo de cura da doença, aumentando o processo de cicatrização da lesão. Desse modo, algumas alternativas terapêuticas vêm sendo utilizadas. O imiquimod (5%) é um imunomodulador para uso tópico como creme. Esta droga exibe atividade antiviral *in vitro* em modelos experimentais. Tem sido utilizada para o tratamento de verrugas genitais por HPV (COX *et al.*, 2004). O imiquimod foi efetivo para o tratamento da leishmaniose induzida em

camundongos e *in vitro* ativa macrófagos contra a *Leishmania* (BUATES E MATLASHEWSKI, 1999). Estudos mostram que pacientes com leishmaniose cutânea resistentes ao tratamento com antimonial isolado mostrou cura clínica em 90% dos pacientes seguidos com associação do antimonial ao tratamento tópico com imiquimod (AREVALO *et al.*, 2001).

Atualmente, a imunoterapia com vacinas e a modulação da resposta imune, através do uso de citocinas e fatores de crescimento, constituem alternativas promissoras na profilaxia e no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. Pesquisas de novas modalidades terapêuticas para o tratamento da leishmaniose têm sido empreendidas para tentar diminuir os efeitos colaterais que ocorrem com o uso de antimonial e anfotericina B, facilitar o tratamento nas áreas endêmicas da doença, diminuir o tempo de tratamento e os índices crescentes de falha terapêutica. Diante desse quadro e das dificuldades de tratamento é que a imunoterapia associada passa a ser uma alternativa a ser explorada.

Estudos prévios têm mostrado que o fator estimulador de colônia de granulócitos e mononuclear recombinante (rhGM-CSF), que é uma glicoproteína com papel importante no crescimento de células hematopoiéticas induzindo o crescimento de colônias maduras de granulócitos e/ou macrófagos (METCALF E BURGESS, 1982), pode alterar a resposta imune à *Leishmania* em humanos, por aumento da ativação macrofágica, indução de cicatrização e fibrose, e/ou por indução de uma resposta imune Th1 levando a uma apresentação mais eficaz de antígenos (LIESCHKE E BURGESS, 1992; JONES *et al.*, 1993; MANN *et al.*, 2006).

Estudos vêm demonstrando que o rhGM-CSF desempenha papel importante não só na velocidade de formação de cicatriz, quanto na sua qualidade (ALMEIDA *et al.*, 1999; MANN *et al.*, 2006). Almeida e cols. (1999) utilizando GM-CSF injetável nas bordas das úlceras de pacientes com LC, associado à administração endovenosa de antimonial, observaram uma redução em mais de 50% do tempo total de cura das lesões dos pacientes (ALMEIDA *et al.*, 1999). Outro estudo realizado pelo mesmo grupo, mostrou que a administração de antimonial com curativo oclusivo de GM-CSF obtiveram cura de 100% dos cinco pacientes portadores de LC refratária (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Esta modulação parece estar associada a produção de citocinas regulatórias como a IL-10, desde que estudo realizado por Lehmann (1998) demonstrou que GM-CSF é capaz de aumentar em cerca de dez vezes a expressão de RNAm de IL-10,

citocina imunomodulatória (LEHMANN *et al.*, 1998). Adicionalmente, o tratamento com GM-CSF e antimônio aumentou significativamente a produção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico em comparação ao grupo tratado com antimonial isoladamente.

A IL-10 é produzida por uma variedade de células, a exemplo dos linfócitos T CD4⁺, TCD4⁺ CD25⁺, TCD8⁺, monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (BELKAID *et al.*, 2002). Ela é uma potente moduladora da proliferação de linfócitos T CD4⁺ e da produção de citocinas antígeno-específicas do tipo Th1 por estas células, inibe a produção de óxido nítrico (NO) pelos monócitos e macrófagos, além de inibir a capacidade de apresentação de antígenos pelos monócitos através da diminuição da expressão de moléculas HLA-DR e moléculas co-estimulatórias, como CD80, CD86 (O'GARRA E VIEIRA, 2004).

Um estudo realizado por Faria e colaboradores mostrou que a diminuição da exposição *in situ* do receptor de IL-10, foi correlacionada com a resposta inflamatória exacerbada em pacientes com leishmaniose mucosa (FARIA *et al.*, 2005). A presença de um equilíbrio entre a produção de citocinas Th1 e Th2 e entre a resposta imune protetora e a modulação dessa resposta, como observada em indivíduos com a forma subclínica da infecção causada por *L. braziliensis* (FOLLADOR *et al.*, 2002), indica que a modulação da resposta imune pode ser fundamental para evitar o aparecimento das lesões teciduais nos indivíduos que estão expostos à infecção. O dano tecidual observado na leishmaniose cutânea e mucosa é também consequência da incapacidade do hospedeiro de controlar esta resposta. Esse fenômeno torna ainda mais relevante no contexto onde a refratariedade ao tratamento com antimonial pentavalente (Sb^v) e a presença da recidiva se associam aos diversos efeitos colaterais devidos ao uso parenteral de Sb^v ou anfotericina B, limitando o controle adequado da doença. Todos esses fatores ressaltam a importância de pesquisar novas modalidades terapêuticas que contribuam para facilitar o tratamento nas áreas endêmicas tendo como base o conhecimento dos mecanismos da imunopatogênese da LTA e como a imunoterapia pode contribuir para a prevenção da lesão inflamatória associada a essa doença ou diminuir no tempo de cura da lesão.

7.4.3 Tratamento alternativo com Termoterapia ou Crioterapia

Existem tratamentos alternativos sendo testados para LTA. A termoterapia que utiliza calor local da lesão gerado por radio frequência (50°C, 30s) associado ao Sb^v apresentou uma maior cura clínica comparados tratamento convencional (LOPEZ *et al.*, 2012).

A crioterapia com nitrogênio líquido associado ao Sb^v é recomendada para lesões com menos de 1cm, em dois ciclos de 20s por duas sessões com intervalo de três semanas apresentou satisfação em relação a cura clínica em relação aos pacientes com tratamento convencional (ER-RAMI *et al.*, 2013).

CONFLITOS DE INTERESSES

Os participantes do referido estudo não apresentaram conflitos de interesses.

AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores do Serviço de Imunologia (SIM/HUPES) da Universidade Federal da Bahia que sob a coordenação do Dr Edgar Carvalho vêm realizando com louvor trabalhos há mais de 30 anos em uma área endêmica em leishmaniose, que envolve desde diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes à pesquisa para a identificação de novas alternativas terapêuticas e preventivas para o controle desta importante doença negligenciada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, R., A. D'oliveira, Jr., *et al.* Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous Leishmaniasis. J Infect Dis, v.180, n.5, Nov, p.1735-7. 1999.
- Almeida, R. P., J. Brito, *et al.* Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. Am J Trop Med Hyg, v.73, n.1, Jul, p.79-81. 2005.
- Antonelli, L. R., W. O. Dutra, *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. Immunol Lett, v.101, n.2, Nov 15, p.226-30. 2005.
- Arevalo, I., B. Ward, *et al.* Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. Clin Infect Dis, v.33, n.11, Dec 1, p.1847-51. 2001.
- Arraes, S. M., M. T. Marini, *et al.* [Serological investigation of subclinical cutaneous leishmaniasis cases following an outbreak in an endemic area]. Rev Soc Bras Med Trop, v.41, n.2, Mar-Apr, p.205-8. 2008.
- Bacellar, O., H. Lessa, *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. Infect Immun, v.70, n.12, p.6734-40. 2002.
- Badaro, R., T. C. Jones, *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infect Dis, v.154, n.6, p.1003-11. 1986.
- Barral-Netto, M., A. Barral, *et al.* Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol, v.17, n.1, p.21-8. 1995.
- Barrio, A., M. C. Mora, *et al.* Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina. Am J Trop Med Hyg, v.77, n.4, Oct, p.636-9. 2007.
- Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. Nature, v.420, n.6915, Dec 5, p.502-7. 2002.
- Ben Abda, I., F. De Monbrison, *et al.* Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.105, n.1, Jan, p.17-22. 2011.

Benicio Ede, A., E. P. Gadelha, *et al.* Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. An Bras Dermatol, v.86, n.6, Nov-Dec, p.1141-4. 2011.

Bittencourt, A. L. e A. Barral. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.86, n.1, Jan-Mar, p.51-6. 1991.

Bogdan, C., A. Gessner, *et al.* Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. Curr Opin Immunol, v.8, n.4, p.517-25. 1996.

Boggild, A. K., A. P. Ramos, *et al.* Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, v.83, n.2, Aug, p.345-50. 2010

Boggild, A. K., B. M. Valencia, *et al.* Non-invasive cytology brush PCR diagnostic testing in mucosal leishmaniasis: superior performance to conventional biopsy with histopathology. PLoS One, v.6, n.10, p.e26395. 2011.

Bosque, F., N. G. Saravia, *et al.* Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. Scand J Immunol, v.51, n.5, May, p.533-41. 2000.

Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. 2017.
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>.
Acessado em 17.01.2017.

Brelaz-De-Castro, M. C., A. F. De Almeida, *et al.* Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. Cell Immunol, v.279, n.2, Oct, p.180-6. 2012.

Brito, M. E., M. G. Mendonca, *et al.* Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. Clin Diagn Lab Immunol, v.7, n.2, Mar, p.318-21. 2000.

Buates, S. e G. Matlashewski. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. J Infect Dis, v.179, n.6, Jun, p.1485-94. 1999.

Castilho, T. M., J. J. Shaw, *et al.* New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol, v.41, n.2, Feb, p.540-6. 2003.

Cataldo, J. I., F. C. De Queiroz Mello, *et al.* Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. J Clin Lab Anal, v.24, n.5, p.289-94. 2010.

Celeste, B. J., S. O. Angel, *et al.* *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. Braz J Med Biol Res, v.37, n.11, Nov, p.1591-3. 2004.

Chamakh-Ayari, R., R. Bras-Goncalves, *et al.* In vitro evaluation of a soluble *Leishmania* promastigote surface antigen as a potential vaccine candidate against human leishmaniasis. PLoS One, v.9, n.5, p.e92708. 2014.

Cox, J. T., K. U. Petry, *et al.* Using imiquimod for genital warts in female patients. J Womens Health (Larchmt), v.13, n.3, Apr, p.265-71. 2004.

Cunningham, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. Exp Mol Pathol, v.72, n.2, Apr, p.132-41. 2002.

Da-Cruz, A. M., R. Bittar, *et al.* T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. Clin Diagn Lab Immunol, v.9, n.2, Mar, p.251-6. 2002.

Davies, C. R., E. A. Llanos-Cuentas, *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. Epidemiol Infect, v.114, n.2, Apr, p.297-318. 1995.

De Mello, C. X., A. De Oliveira Schubach, *et al.* Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitol Res, v.109, n.3, Sep, p.927-33. 2011.

De Oliveira, A. P., M. C. De Castro, *et al.* Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. J Immunol Methods, v.387, n.1-2, Jan 31, p.245-53. 2013.

De Oliveira, C. I., A. Bafica, *et al.* Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis, v.37, n.11, Dec 1, p.e149-53. 2003.

De Smedt, T., M. Van Mechelen, *et al.* Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. Eur J Immunol, v.27, n.5, May, p.1229-35. 1997.

Er-Rami, M., S. Benjelloun, *et al.* [Cutaneous leishmaniasis in the military hospital Moulay Ismail of Meknes (Morocco): about 49 cases diagnosed between 2005 and 2011]. Pathol Biol (Paris), v.61, n.2, Apr, p.49-53. 2013.

Faria, D. R., K. J. Gollob, *et al.* Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. Infect Immun, v.73, n.12, Dec, p.7853-9. 2005.

Follador, I., C. Araujo, *et al.* Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. Clin Infect Dis, v.34, n.11, p.E54-8. 2002.

_____. Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Vaccine, v.20, n.9-10, p.1365-8. 2002.

Francino, O., L. Altet, *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Vet Parasitol, v.137, n.3-4, Apr 30, p.214-21. 2006.

Giudice, A., C. Vendrame, *et al.* Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. BMC Infect Dis, v.12, p.75. 2012.

Gomes-Silva, A., R. De Cassia Bittar, *et al.* Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? Clin Exp Immunol, v.149, n.3, Sep, p.440-4. 2007.

Gomes, C. M., M. V. Cesetti, *et al.* Field validation of SYBR(R) Green- and TaqMan(R)-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in a *Leishmania (V.) braziliensis*-endemic area. J Clin Microbiol, Dec 07. 2016.

Gontijo, B. e L. De Carvalho M de. [American cutaneous leishmaniasis]. Rev Soc Bras Med Trop, v.36, n.1, Jan-Feb, p.71-80. 2003.

Gonzalez, U., M. Pinart, *et al.* Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Cochrane Database Syst Rev, n.2, p.CD004834. 2009.

Handman, E. e D. V. Bullen. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. Trends Parasitol, v.18, n.8, Aug, p.332-4. 2002.

Jones, T. C. The effects of rhGM-CSF on macrophage function. Eur J Cancer, v.29A Suppl 3, p.S10-3. 1993.

Jones, T. C., W. D. Johnson, Jr., *et al.* Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. J Infect Dis, v.156, n.1, p.73-83. 1987.

Junqueira Pedras, M., M. Orsini, *et al.* Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis, v.47, n.3, Nov, p.477-85. 2003.

Kar, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. Crit Rev Microbiol, v.21, n.2, p.123-52. 1995.

Lehmann, M. H. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor triggers interleukin-10 expression in the monocytic cell line U937. Mol Immunol, v.35, n.8, Jun, p.479-85. 1998.

Lieschke, G. J. e A. W. Burgess. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (2). N Engl J Med, v.327, n.2, Jul 9, p.99-106. 1992.

Llanos-Cuentas, A., G. Tulliano, *et al.* Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. Clin Infect Dis, v.46, n.2, Jan 15, p.223-31. 2008.

Lopez, L., M. Robayo, *et al.* Thermotherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. Trials, v.13, May 17, p.58. 2012.

Mann, A., K. Niekisch, *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is essential for normal wound healing. J Investig Dermatol Symp Proc, v.11, n.1, Sep, p.87-92. 2006.

Marsden, P. D. Cutaneous leishmaniasis. Bmj, v.300, n.6741, p.1716-7. 1990a.

_____. Leishmaniasis. Bmj, v.300, n.6725, p.666-7. 1990b.

_____. Mucocutaneous leishmaniasis. Bmj, v.301, n.6753, p.656-7. 1990c.

_____. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Tres Bracos, Bahia-Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, v.27, n.2, p.93-101. 1994.

Medeiros, A. C., S. S. Rodrigues, *et al.* Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Braz J Med Biol Res, v.35, n.4, Apr, p.421-4. 2002.

Metcalf, D. e A. W. Burgess. Clonal analysis of progenitor cell commitment of granulocyte or macrophage production. J Cell Physiol, v.111, n.3, Jun, p.275-83. 1982.

Moll, H., A. Scharner, *et al.* Increased interleukin 4 (IL-4) receptor expression and IL-4-induced decrease in IL-12 production by Langerhans cells infected with *Leishmania major*. Infect Immun, v.70, n.3, Mar, p.1627-30. 2002.

Muller, K., G. Van Zandbergen, *et al.* Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. Med Microbiol Immunol (Berl), v.190, n.1-2, Nov, p.73-6. 2001.

Muniz, A. C., O. Bacellar, *et al.* Immunologic Markers of Protection in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection: A 5-Year Cohort Study. J Infect Dis, v.214, n.4, Aug 15, p.570-6. 2016.

Murray, H. W., G. L. Spitalny, *et al.* Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. J Immunol, v.134, n.3, Mar, p.1619-22. 1985.

Newlove, T. Guimaraes, L. H., Antihelminthic therapy and antimony in cutaneous leishmaniasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients co-infected with helminths and *Leishmania braziliensis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. v.84, n.4, Apr, p.551-5. 2011.

Netto, E. M., P. D. Marsden, *et al.* Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.84, n.3, p.367-70. 1990.

O'garra, A. e P. Vieira. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. Nat Med, v.10, n.8, Aug, p.801-5. 2004.

Pedral-Sampaio, G., J. S. Alves, *et al.* Detection of IgG Anti-Leishmania Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis. PLoS One, v.11, n.9, p.e0162793. 2016.

Pereira, M. R., F. Rocha-Silva, *et al.* Comparison between conventional and real-time PCR assays for diagnosis of visceral leishmaniasis. Biomed Res Int, v.2014, p.639310. 2014.

Reviewed Porfirio-Passos, G., P. M. A. Silva, *et al.* Métodos para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana - revisão. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer, Goiânia. 8: 1232-1248 p. 2012.

Ribeiro-De-Jesus, A., R. P. Almeida, *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. Braz J Med Biol Res, v.31, n.1, p.143-8. 1998.

Rocha, R. D., C. M. Gontijo, *et al.* [Anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in american cutaneous leishmaniasis]. Rev Soc Bras Med Trop, v.35, n.6, Nov-Dec, p.551-62. 2002.

Romero, G. A., R. N. Sampaio, *et al.* Sensitivity of lymph node aspiration in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.94, n.4, p.509-11. 1999.

Saenz, R. E., C. G. De Rodriguez, *et al.* Efficacy and toxicity of pentostam against Panamanian mucosal leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, v.44, n.4, Apr, p.394-8. 1991.

Salaiza-Suazo, N., P. Volkow, *et al.* Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. Trop Med Int Health, v.4, n.12, Dec, p.801-11. 1999.

Schriefer, A., M. E. Wilson, *et al.* Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis, v.21, n.5, Oct, p.483-8. 2008.

Solbach, W. e T. Laskay. The host response to *Leishmania* infection. Adv Immunol, v.74, p.275-317. 2000.

Szargiki, R., E. A. Castro, *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Parana, Brazil. Braz J Infect Dis, v.13, n.1, Feb, p.47-52. 2009.

Titus, R. G. e J. M. Ribeiro. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. Science, v.239, n.4845, p.1306-8. 1988.

Trinchieri, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu Rev Immunol, v.13, p.251-76. 1995.

Van Zandbergen, G., N. Hermann, *et al.* *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. Infect Immun, v.70, n.8, Aug, p.4177-84. 2002.

Vega-Lopez, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis, v.16, n.2, Apr, p.97-101. 2003.

Weigle, K. A., M. De Davalos, *et al.* Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. Am J Trop Med Hyg, v.36, n.3, May, p.489-96. 1987.

Weirather, J. L., S. M. Jeronimo, *et al.* Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. J Clin Microbiol, v.49, n.11, Nov, p.3892-904. 2011.

WHO. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis of WHO. 2017. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acessado em 17.01.2017.

Yoneda, T. [Relation between malnutrition and cell-mediated immunity in pulmonary tuberculosis]. Kekkaku, v.64, n.10, Oct, p.633-40. 1989.

Yurdakul, P. [Immunopathogenesis of *Leishmania* infections]. Mikrobiyol Bul, v.39, n.3, Jul, p.363-81. 2005.

8 CONCLUSÃO GERAL

O antígeno rSm29 do *Schistosoma mansoni* induziu um perfil de ativação não convencional nas MoDCs de pacientes com leishmaniose infectadas pela *L. braziliensis*. Estas células apresentaram elevada expressão de marcadores de ativação, ao tempo em que apresentaram uma diminuição na expressão de IL-12 e aumento na expressão de IL-10 intracelular, sem alteração na infectividade das leishmanias. Neste mesmo ambiente celular, observou-se um aumento nas moléculas associadas a regulação celular, tanto pelo linfócitos T CD4⁺, como T CD8⁺, além de redução nos sobrenadantes das co-culturas dos níveis de IL-12 e aumento de IL-10, sem alterar os níveis de TNF, necessários ao controle parasitário. O efeito observado pela estimulação com o rSm29 não pode ser estendido a infecção pelo *S. mansoni*, haja vista as MoDCs e linfócitos de indivíduos infectados por este helminto apresentarem um menor grau de ativação e um perfil regulatório que favoreceu a susceptibilidade à infecção pela *Leishmania* nestes indivíduos. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o antígeno rSm29 tem potencial para atuar como imunomodulador da resposta imune exacerbada responsável pela patogênese da leishmaniose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Actor, J. K., M. Shirai, *et al.* Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.3, Feb 1, p.948-52. 1993.
- Agrawal, S., A. Agrawal, *et al.* Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. J Immunol, v.171, n.10, Nov 15, p.4984-9. 2003.
- Almeida, R., A. D'oliveira, Jr., *et al.* Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous Leishmaniasis. J Infect Dis, v.180, n.5, Nov, p.1735-7. 1999.
- Almeida, R. P., J. Brito, *et al.* Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. Am J Trop Med Hyg, v.73, n.1, Jul, p.79-81. 2005.
- Alves, C. C., N. Araujo, *et al.* Sm29, but not Sm22.6 retains its ability to induce a protective immune response in mice previously exposed to a *Schistosoma mansoni* infection. PLoS Negl Trop Dis, v.9, n.2, Feb, p.e0003537. 2015.
- Ameen, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. Clin Exp Dermatol, v.35, n.7, Oct, p.699-705. 2010.
- Amprey, J. L., G. F. Spath, *et al.* Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with *Leishmania donovani*. Infect Immun, v.72, n.1, Jan, p.589-92. 2004.
- Antonelli, L. R., W. O. Dutra, *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. Immunol Lett, v.101, n.2, Nov 15, p.226-30. 2005.
- Araujo, M. I., B. Hoppe, *et al.* Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. J Infect Dis, v.190, n.10, Nov 15, p.1797-803. 2004.
- Araujo, M. I., B. S. Hoppe, *et al.* *Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.99, n.5 Suppl 1, p.27-32. 2004.
- Araujo, M. I., A. A. Lopes, *et al.* Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. Int Arch Allergy Immunol, v.123, n.2, p.145-8. 2000.

Arevalo, I., B. Ward, *et al.* Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. Clin Infect Dis, v.33, n.11, Dec 1, p.1847-51. 2001.

Arraes, S. M., M. T. Marini, *et al.* [Serological investigation of subclinical cutaneous leishmaniasis cases following an outbreak in an endemic area]. Rev Soc Bras Med Trop, v.41, n.2, Mar-Apr, p.205-8. 2008.

Atochina, O. e D. Harn. Prevention of psoriasis-like lesions development in fsn/fsn mice by helminth glycans. Exp Dermatol, v.15, n.6, Jun, p.461-8. 2006.

Azeredo-Coutinho, R.B., M. I. Pimentel, *et al.* Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. Acta Trop., v.154, p.42-9. 2016.

Bacci, A., C. Montagnoli, *et al.* Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. J Immunol, v.168, n.6, Mar 15, p.2904-13. 2002.

Bacellar, O., H. Lessa, *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. Infect Immun, v.70, n.12, p.6734-40. 2002.

Badaro, R., T. C. Jones, *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infect Dis, v.154, n.6, p.1003-11. 1986.

Bafica, A. M., L. S. Cardoso, *et al.* Changes in T-Cell and Monocyte Phenotypes In Vitro by *Schistosoma mansoni* Antigens in Cutaneous Leishmaniasis Patients. J Parasitol Res, v.2012, p.520308. 2012.

_____. *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response in vitro during cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.106, n.7, Nov, p.856-63. 2011.

Baratta-Masini, A., A. Teixeira-Carvalho, *et al.* Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. Front Biosci, v.12, p.839-49. 2007.

Barral-Netto, M., A. Barral, *et al.* Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol, v.17, n.1, p.21-8. 1995.

_____. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. Science, v.257, n.5069, p.545-8. 1992.

Barrio, A., M. C. Mora, *et al.* Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary *Leishmaniasis* in disease-endemic areas of northern Argentina. Am J Trop Med Hyg, v.77, n.4, Oct, p.636-9. 2007.

Belkaid, Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. Expert Opin Biol Ther, v.3, n.6, Sep, p.875-85. 2003.

Belkaid, Y., K. F. Hoffmann, *et al.* The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J Exp Med, v.194, n.10, Nov 19, p.1497-506. 2001.

Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. Nature, v.420, n.6915, Dec 5, p.502-7. 2002.

Ben Abda, I., F. De Monbrison, *et al.* Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.105, n.1, Jan, p.17-22. 2011.

Benicio Ede, A., E. P. Gadelha, *et al.* Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. An Bras Dermatol, v.86, n.6, Nov-Dec, p.1141-4. 2011.

Bennett, S. R., F. R. Carbone, *et al.* Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. Nature, v.393, n.6684, Jun 4, p.478-80. 1998.

Bittar, R. C., Nogueira, R. S., *et al.* T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. v.102, n.5, p. 625-30. 2007.

Bittencourt, A. L. e A. Barral. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.86, n.1, Jan-Mar, p.51-6. 1991.

Bogdan, C., A. Gessner, *et al.* Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. Curr Opin Immunol, v.8, n.4, p.517-25. 1996.

Bogdan, C., M. Rollinghoff, *et al.* The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol Ver. v.173, p. 17-26. 2000.

Boggild, A. K., A. P. Ramos, *et al.* Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, v.83, n.2, Aug, p.345-50. 2010

Boggild, A. K., B. M. Valencia, *et al.* Non-invasive cytology brush PCR diagnostic testing in mucosal leishmaniasis: superior performance to conventional biopsy with histopathology. PLoS One, v.6, n.10, p.e26395. 2011.

Bosque, F., N. G. Saravia, *et al.* Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. Scand J Immunol, v.51, n.5, May, p.533-41. 2000.

Bourreau, E., C. Ronet, *et al.* Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. Infect Immun, v.77, n.4, Apr, p.1465-74. 2009.

Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. 2017. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>. Acessado em 17.01.2017.

Brelaz-De-Castro, M. C., A. F. De Almeida, *et al.* Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. Cell Immunol, v.279, n.2, Oct, p.180-6. 2012.

Briand, V., L. Watier, *et al.* Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: protective effect of schistosomiasis on malaria in senegalese children? Am J Trop Med Hyg, v.72, n.6, Jun, p.702-7. 2005.

Brito, M. E., M. G. Mendonca, *et al.* Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. Clin Diagn Lab Immunol, v.7, n.2, Mar, p.318-21. 2000.

Buates, S. e G. Matlashewski. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. J Infect Dis, v.179, n.6, Jun, p.1485-94. 1999.

Butterworth, A. E., D. W. Dunne, *et al.* Immunity and morbidity in *Schistosoma mansoni* infection: quantitative aspects. Am J Trop Med Hyg, v.55, n.5 Suppl, p.109-15. 1996.

Cardoso, F. C., G. C. Macedo, *et al.* *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. PLoS Negl Trop Dis, v.2, n.10, Oct 01, p.e308. 2008.

Cardoso, F. C., J. M. Pinho, *et al.* Identification of a new *Schistosoma mansoni* membrane-bound protein through bioinformatic analysis. Genet Mol Res, v.5, n.4, p.609-18. 2006.

Cardoso, L. S., S. C. Oliveira, *et al.* *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. Clin Exp Immunol, v.160, n.2, May, p.266-74. 2010.

_____. *Schistosoma mansoni* antigen-driven interleukin-10 production in infected asthmatic individuals. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.101 Suppl 1, Sep, p.339-43. 2006.

Cardoso, T. M., A. Machado, *et al.* Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. Infect Immun, v.83, n.3, Mar, p.898-906. 2015.

Carvalho, E. M., A. Barral, *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta Trop, v.56, n.4, p.315-25. 1994.

Carvalho, L. P., S. Passos, *et al.* Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. Scand J Immunol, v.61, n.4, Apr, p.337-42. 2005.

- Carvalho, L. P., E. J. Pearce, *et al.* Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high levels of TNF-alpha, whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell responses. J Immunol, v.181, n.9, Nov 1, p.6473-80. 2008.
- Castilho, T. M., J. J. Shaw, *et al.* New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol, v.41, n.2, Feb, p.540-6. 2003.
- Cataldo, J. I., F. C. De Queiroz Mello, *et al.* Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. J Clin Lab Anal, v.24, n.5, p.289-94. 2010.
- Caux, C., C. Massacrier, *et al.* Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J Exp Med, v.180, n.4, Oct 1, p.1263-72. 1994.
- Celes, F. S., E. Trovatti, *et al.* DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. Sci Rep, v.6, Dec 06, p.38330. 2016.
- Celeste, B. J., S. O. Angel, *et al.* *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. Braz J Med Biol Res, v.37, n.11, Nov, p.1591-3. 2004.
- Cella, M., D. Scheidegger, *et al.* Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. J Exp Med, v.184, n.2, Aug 1, p.747-52. 1996.
- Chamakh-Ayari, R., R. Bras-Goncalves, *et al.* In vitro evaluation of a soluble *Leishmania* promastigote surface antigen as a potential vaccine candidate against human leishmaniasis. PLoS One, v.9, n.5, p.e92708. 2014.
- Choi, B. S; Kropf P. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization ex vivo and in vitro. Parasite Immunology, Oxford, v. 31, n. 4, p. 199-209, 2009.
- Coelho Júnior, L. G., G. B. Machado, *et al.* American Cutaneous Leishmaniasis is refractory to medical treatment: case report. Rev Panam Infectol 2016.
- Cooke, A., P. Tonks, *et al.* Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. Parasite Immunol, v.21, n.4, p.169-76. 1999.
- Corinti, S., C. Albanesi, *et al.* Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. J Immunol, v.166, n.7, Apr 01, p.4312-8. 2001.
- Costa, J. M., I. T. Balby, *et al.* [Comparative study of American tegumentary leishmaniasis between childhood and teenagers from the endemic areas Buriticupu, Maranhao and Corte de Pedra, Bahia, Brazil]. Rev Soc Bras Med Trop, v.31, n.3, May-Jun, p.279-88. 1998.

Coutinho, S. G. C. Pirmez, Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.96, n.1, Apr, p. 173-8. 2002.

Cox, J. T., K. U. Petry, *et al.* Using imiquimod for genital warts in female patients. J Womens Health (Larchmt), v.13, n.3, Apr, p.265-71. 2004.

Cunningham, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. Exp Mol Pathol, v.72, n.2, Apr, p.132-41. 2002.

D'ostiani, C. F., G. Del Sero, *et al.* Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. J Exp Med, v.191, n.10, May 15, p.1661-74. 2000.

Da-Cruz, A. M., R. Bittar, *et al.* T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. Clin Diagn Lab Immunol, v.9, n.2, Mar, p.251-6. 2002.

Da-Cruz, A. M., M. P. De Oliveira, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.91, n.2, p.225-9. 1996.

Davies, C. R., E. A. Llanos-Cuentas, *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. Epidemiol Infect, v.114, n.2, Apr, p.297-318. 1995.

De Almeida, T. V., J. S. Fernandes, *et al.* *Schistosoma mansoni* antigens alter activation markers and cytokine profile in lymphocytes of patients with asthma. Acta Trop, v.166, Feb, p.268-279. 2017.

De Mello, C. X., A. De Oliveira Schubach, *et al.* Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitol Res, v.109, n.3, Sep, p.927-33. 2011.

De Oliveira, A. P., M. C. De Castro, *et al.* Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. J Immunol Methods, v.387, n.1-2, Jan 31, p.245-53. 2013.

De Oliveira, C. I., A. Bafica, *et al.* Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis, v.37, n.11, Dec 1, p.e149-53. 2003.

De Saint-Vis, B., I. Fugier-Vivier, *et al.* The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. J Immunol, v.160, n.4, Feb 15, p.1666-76. 1998.

De Smedt, T., M. Van Mechelen, *et al.* Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. Eur J Immunol, v.27, n.5, May, p.1229-35. 1997.

Dhodapkar, M. V.; Steinman, R. M. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific cd8(+) regulatory t cells in vivo in humans. Blood, v. 100, n. 1, p. 174-177, 2002.

Dorcas S. Yole, K. T. S., Kiio Kithome, Michael M. Gicheru. Studies on the interaction of *Schistosoma mansoni* and *Leishmania major* in experimentally infected Balb/c mice. Afriacan Journal of Health Sciences v.14, n.1-2. 2007.

Dowling, D. J., C. M. Noone, *et al.* *Ascaris lumbricoides* pseudocoelomic body fluid induces a partially activated dendritic cell phenotype with Th2 promoting ability in vivo. Int J Parasitol, v.41, n.2, Feb, p.255-61. 2011.

Duraes, F. V., N. B. Carvalho, *et al.* IL-12 and TNF-alpha production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. Immunol Lett, v.125, n.1, Jun 30, p.72-7. 2009.

Elliott, D. E., R. W. Summers, *et al.* Helminths as governors of immune-mediated inflammation. Int J Parasitol, v.37, n.5, Apr, p.457-64. 2007.

Elrefaei, M., N. El-Sheikh, *et al.* HCV-specific CD27- CD28- memory T cells are depleted in hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni* co-infection. Immunology, v.110, n.4, Dec, p.513-8. 2003.

Er-Rami, M., S. Benjelloun, *et al.* [Cutaneous leishmaniasis in the military hospital Moulay Ismail of Meknes (Morocco): about 49 cases diagnosed between 2005 and 2011]. Pathol Biol (Paris), v.61, n.2, Apr, p.49-53. 2013.

Everts, B., A. A. Adegnika, *et al.* Functional impairment of human myeloid dendritic cells during *Schistosoma haematobium* infection. PLoS Negl Trop Dis, v.4, n.4, p.e667. 2010.

Faria, D. R., K. J. Gollob, *et al.* Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. Infect Immun, v.73, n.12, Dec, p.7853-9. 2005.

Favali, C., N. Tavares, *et al.* *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. J Leukoc Biol, v.82, n.6, Dec, p.1401-6. 2007.

Fernandez, N. C., A. Lozier, *et al.* Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. Nat Med, v.5, n.4, Apr, p.405-11. 1999.

Follador, I., C. Araujo, *et al.* Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. Clin Infect Dis, v.34, n.11, p.E54-8. 2002.

_____. Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Vaccine, v.20, n.9-10, p.1365-8. 2002.

Francino, O., L. Altet, *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Vet Parasitol, v.137, n.3-4, Apr 30, p.214-21. 2006.

Fujiwara, R. T., G. G. Cancado, *et al.* *Necator americanus* infection: a possible cause of altered dendritic cell differentiation and eosinophil profile in chronically infected individuals. PLoS Negl Trop Dis, v.3, n.3, p.e399. 2009.

Geiger, S. M., C. L. Massara, *et al.* Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. Clin Exp Immunol, v.136, n.2, May, p.334-40. 2004.

Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, *et al.* Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. J Exp Med, v.195, n.3, Feb 4, p.327-33. 2002.

Gilliet, M.; Liu, Y. J. Generation of human cd8 t regulatory cells by cd40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. J. Exp. Med., v. 195, n. 6, p. 695-704, 2002.

Giudice, A., C. Vendrame, *et al.* Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. BMC Infect Dis, v.12, p.75. 2012.

Gollob, K. J., L. R. Antonelli, *et al.* Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. Int Immunopharmacol, v.8, n.10, Oct, p.1338-43. 2008.

Gomes-Silva, A., R. De Cassia Bittar, *et al.* Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? Clin Exp Immunol, v.149, n.3, Sep, p.440-4. 2007.

Gomes, C. M., M. V. Cesetti, *et al.* Field validation of SYBR(R) Green- and TaqMan(R)-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in a *Leishmania (V.) braziliensis*-endemic area. J Clin Microbiol, Dec 07. 2016.

Gontijo, B. e L. De Carvalho M de. [American cutaneous leishmaniasis]. Rev Soc Bras Med Trop, v.36, n.1, Jan-Feb, p.71-80. 2003.

Gonzalez, U., M. Pinart, *et al.* Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Cochrane Database Syst Rev, n.2, p.CD004834. 2009.

Handman, E. e D. V. Bullen. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. Trends Parasitol, v.18, n.8, Aug, p.332-4. 2002.

Hernandez, H. J., A. H. Sharpe, *et al.* Experimental murine schistosomiasis in the absence of B7 costimulatory molecules: reversal of elicited T cell cytokine profile and partial inhibition of egg granuloma formation. J Immunol, v.162, n.5, Mar 1, p.2884-9. 1999.

Jankovic, D., M. C. Kullberg, *et al.* Parasite-induced Th2 polarization is associated with down-regulated dendritic cell responsiveness to Th1 stimuli and a transient delay in T lymphocyte cycling. J Immunol, v.173, n.4, Aug 15, p.2419-27. 2004.

Jirmanus, L., M. J. Glesby, *et al.* Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. Am J Trop Med Hyg, v.86, n.3, Mar, p.426-33. 2012.

Jones, T. C. The effects of rhGM-CSF on macrophage function. Eur J Cancer, v.29A Suppl 3, p.S10-3. 1993.

Jones, T. C., W. D. Johnson, Jr., *et al.* Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. J Infect Dis, v.156, n.1, p.73-83. 1987.

Jonuleit, H.; Schmitt, E.; *et al.* Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating cd4(+) t cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J. Exp. Med., v. 192, n. 9, p. 1213-1222, 2000.

Junqueira Pedras, M., M. Orsini, *et al.* Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis, v.47, n.3, Nov, p.477-85. 2003.

Kamau, S. W., R. Nunez, *et al.* Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. BMC Pharmacol, v.1, p.1. 2001.

Kane, M. M. e D. M. Mosser. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. Curr Opin Hematol, v.7, n.1, Jan, p.26-31. 2000.

Kar, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. Crit Rev Microbiol, v.21, n.2, p.123-52. 1995.

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

Khayeka-Wandabwa, C., H. Kutima, *et al.* Combination therapy using Pentostam and Praziquantel improves lesion healing and parasite resolution in BALB/c mice co-infected with *Leishmania major* and *Schistosoma mansoni*. Parasit Vectors, v.6, p.244. 2013.

Kim, J. H., T. H. Kang, *et al.* Blocking the immunosuppressive axis with small interfering RNA targeting interleukin (IL)-10 receptor enhances dendritic cell-based vaccine potency. Clin Exp Immunol, v.165, n.2, Aug, p.180-9. 2011.

- King, C. L., A. Medhat, *et al.* Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. J Immunol, v.156, n.12, Jun 15, p.4715-21. 1996.
- La Flamme, A. C., K. Ruddenklau, *et al.* Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. Infect Immun, v.71, n.9, Sep, p.4996-5004. 2003.
- La Flamme, A. C., P. Scott, *et al.* Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. Parasite Immunol, v.24, n.7, Jul, p.339-45. 2002.
- Laufs, H., K. Muller, *et al.* Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. Infect Immun, v.70, n.2, Feb, p.826-35. 2002.
- Lehmann, M. H. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor triggers interleukin-10 expression in the monocytic cell line U937. Mol Immunol, v.35, n.8, Jun, p.479-85. 1998.
- Lemaitre, M., L. Watier, *et al.* Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: additional evidence of the protective effect of Schistosomiasis on malaria in Senegalese children. Am J Trop Med Hyg, v.90, n.2, Feb, p.329-34. 2014.
- Leon, B., M. Lopez-Bravo, *et al.* Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. Immunity, v.26, n.4, Apr, p.519-31. 2007.
- Lessa, H. A., P. Machado, *et al.* Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. Am J Trop Med Hyg, v.65, n.2, p.87-9. 2001.
- Lieschke, G. J. e A. W. Burgess. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (2). N Engl J Med, v.327, n.2, Jul 9, p.99-106. 1992.
- Lima, L. M., L. S. Cardoso, *et al.* *Schistosoma* antigens downregulate CXCL9 production by PBMC of HTLV-1-infected individuals. Acta Trop, v.167, Dec 28, p.157-162. 2017.
- Lima, L. M., S. B. Santos, *et al.* *Schistosoma* antigens downmodulate the in vitro inflammatory response in individuals infected with human T cell lymphotropic virus type 1. Neuroimmunomodulation, v.20, n.4, p.233-8. 2013.
- Liu, K.; Iyoda, T., *et al.* Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. J. Exp. Med., v. 196, n. 8, p. 1091-1097, 2002.

Llanos-Cuentas, A., G. Tulliano, *et al.* Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. Clin Infect Dis, v.46, n.2, Jan 15, p.223-31. 2008.

Lopes, D. M., J. S. Fernandes, *et al.* Dendritic cell profile induced by *Schistosoma mansoni* antigen in cutaneous leishmaniasis patients. Biomed Res Int, v.2014, p.743069. 2014.

Lopez, L., M. Robayo, *et al.* Thermoherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. Trials, v.13, May 17, p.58. 2012.

Louzir, H. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *leishmania major*. The Journal of Infectious Diseases, v.177, p.1687-1695. 1998.

Lyke, K. E., A. Dicko, *et al.* Association of *Schistosoma haematobium* infection with protection against acute Plasmodium falciparum malaria in Malian children. Am J Trop Med Hyg, v.73, n.6, Dec, p.1124-30. 2005.

Macdonald, A. S., E. A. Patton, *et al.* Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction. J Immunol, v.168, n.9, May 1, p.4643-9. 2002.

Macdonald, A. S., A. D. Straw, *et al.* CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. J Immunol, v.167, n.4, Aug 15, p.1982-8. 2001.

_____. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. J Immunol, v.168, n.2, Jan 15, p.537-40. 2002.

Mann, A., K. Niekisch, *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is essential for normal wound healing. J Invest Dermatol Symp Proc, v.11, n.1, Sep, p.87-92. 2006.

Markikou-Ouni, W., Y. Ben Achour-Chenik, *et al.* Effects of *Leishmania major* clones showing different levels of virulence on infectivity, differentiation and maturation of human dendritic cells. Clin Exp Immunol, v.169, n.3, Sep, p.273-80. 2012.

Marovich, M. A., M. A. McDowell, *et al.* IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. J Immunol, v.164, n.11, Jun 1, p.5858-65. 2000.

Marple, A., W. Wu, *et al.* Cutting Edge: Helminth Coinfection Blocks Effector Differentiation of CD8 T Cells through Alternate Host Th2- and IL-10-Mediated Responses. J Immunol, v.198, n.2, Jan 15, p.634-639. 2017.

Marsden, P. D. Cutaneous leishmaniasis. Bmj, v.300, n.6741, p.1716-7. 1990a.

_____. Leishmaniasis. Bmj, v.300, n.6725, p.666-7. 1990b.

_____. Mucocutaneous leishmaniasis. Bmj, v.301, n.6753, p.656-7. 1990c.

_____. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis L(V)b* in Tres Bracos, Bahia-Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, v.27, n.2, p.93-101. 1994.

Matos, G. I., J. Covas Cde, *et al.* IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN-gamma production. BMC Infect Dis, v.7, p.33. 2007.

Mcguirk, P., C. Mccann, *et al.* Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. J Exp Med, v.195, n.2, Jan 21, p.221-31. 2002.

Mckee, A. S., F. Dzierszynski, *et al.* Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. J Immunol, v.173, n.4, Aug 15, p.2632-40. 2004.

Mckee, A. S. e E. J. Pearce. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. J Immunol, v.173, n.2, Jul 15, p.1224-31. 2004.

Medeiros, A. C., S. S. Rodrigues, *et al.* Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Braz J Med Biol Res, v.35, n.4, Apr, p.421-4. 2002.

Medeiros, M., Jr., J. P. Figueiredo, *et al.* *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. J Allergy Clin Immunol, v.111, n.5, May, p.947-51. 2003.

Mendonça, C. F. S. et al. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Northbrook, v. 53, n. 2, p. 195-201, 1995.

Metcalf, D. and A. W. Burgess. Clonal analysis of progenitor cell commitment of granulocyte or macrophage production. J Cell Physiol, v.111, n.3, Jun, p.275-83. 1982.

Miranda-Vera, C. A. Llanos-Cuentas, *et al.* Randomized, Double-Blind Clinical Trial of Topical Imiquimod 5% with Parenteral Meglumine Antimoniate in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Peru. Clinical Infectious Diseases, v. 40, p.1395–1403. 2005.

Moll, H., A. Scharner, *et al.* Increased interleukin 4 (IL-4) receptor expression and IL-4-induced decrease in IL-12 production by Langerhans cells infected with *Leishmania major*. Infect Immun, v.70, n.3, Mar, p.1627-30. 2002.

- Moraes, M. A. e F. T. Silveira. [Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.36, n.5, Sep-Oct, p.459-63. 1994.
- Moser, M. e K. M. Murphy. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. Nat Immunol, v.1, n.3, Sep, p.199-205. 2000.
- Muller, K., G. Van Zandbergen, *et al.* Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. Med Microbiol Immunol (Berl), v.190, n.1-2, Nov, p.73-6. 2001.
- Muniz, A. C., O. Bacellar, *et al.* Immunologic Markers of Protection in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection: A 5-Year Cohort Study. J Infect Dis, v.214, n.4, Aug 15, p.570-6. 2016.
- Murray, H. W., C. M. Lu, *et al.* Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. Infect Immun, v.70, n.11, Nov, p.6284-93. 2002.
- Murray, H. W., A. L. Moreira, *et al.* Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. J Infect Dis, v.188, n.3, Aug 1, p.458-64. 2003.
- Murray, H. W., G. L. Spitalny, *et al.* Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. J Immunol, v.134, n.3, Mar, p.1619-22. 1985.
- Nausch, N., D. Louis, *et al.* Age-related patterns in human myeloid dendritic cell populations in people exposed to *Schistosoma haematobium* infection. PLoS Negl Trop Dis, v.6, n.9, p.e1824.
- Netto, E. M., P. D. Marsden, *et al.* Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.84, n.3, p.367-70. 1990.
- Ng, L. G., A. Hsu, *et al.* Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. PLoS Pathog, v.4, n.11, Nov, p.e1000222. 2008.
- Novais, F. O., L. P. Carvalho, *et al.* Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. PLoS Pathog, v.9, n.7, p.e1003504. 2013.
- Nylen, S. e S. Gautam. Immunological perspectives of leishmaniasis. J Glob Infect Dis, v.2, n.2, May, p.135-46. 2010.
- O'garra, A. e P. Vieira. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. Nat Med, v.10, n.8, Aug, p.801-5. 2004.
- O'neal, S. E., L. H. Guimaraes, *et al.* Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis, v.195, n.1, Jan 1, p.142-8. 2007.

Okano, M., A. R. Satoskar, *et al.* Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. J Immunol, v.167, n.1, Jul 1, p.442-50. 2001.

Oliveira, R. R., K. J. Gollob, *et al.* *Schistosoma mansoni* infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. Microbes Infect, v.11, n.2, Feb, p.223-9. 2009.

Oliveira, S. C., B. C. Figueiredo, *et al.* A double edged sword: *Schistosoma mansoni* Sm29 regulates both Th1 and Th2 responses in inflammatory mucosal diseases. Mucosal Immunol, v.9, n.6, Nov, p.1366-1371. 2016.

Oppmann, B.; Lesley, R., *et al.* Novel p19 protein engages il-12p40 to form a cytokine, il-23, with biological activities similar as well as distinct from il-12. Immunity, v. 13, n. 5, p. 715-725, 2000.

Pacifico, L. G., F. A. Marinho, *et al.* *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells independent of interleukin-10. Infect Immun, v.77, n.1, Jan, p.98-107. 2009.

Pearce, E. J., P. Caspar, *et al.* Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. J Exp Med, v.173, n.1, p.159-66. 1991.

Pearce, E. J. e A. S. Macdonald. The immunobiology of schistosomiasis. Nat Rev Immunol, v.2, n.7, Jul, p.499-511. 2002.

Pedral-Sampaio, G., J. S. Alves, *et al.* Detection of IgG Anti-Leishmania Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis. PLoS One, v.11, n.9, p.e0162793. 2016.

Pereira, M. R., F. Rocha-Silva, *et al.* Comparison between conventional and real-time PCR assays for diagnosis of visceral leishmaniasis. Biomed Res Int, v.2014, p.639310. 2014.

Perez-Franco, J. E., M. L. Cruz-Barrera, *et al.* Clinical and Parasitological Features of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis that Did Not Respond to Treatment with Meglumine Antimoniate. PLoS Negl Trop Dis, v.10, n.5, May, p.e0004739. 2016.

Pinheiro, C. S., A. P. Ribeiro, *et al.* A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. Parasite Immunol, v.36, n.7, Jul, p.303-12. 2014.

Porto, A. F., S. B. Santos, *et al.* Helminthic infection down-regulates type 1 immune responses in human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) carriers and is more prevalent in HTLV-1 carriers than in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Infect Dis, v.191, n.4, Feb 15, p.612-8. 2005.

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

Reis, E. A., T. M. Azevedo, et al. Naive donor responses to *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens. Scand J Immunol, v.66, n.6, Dec, p.662-70. 2007.

Resende, M., D. Moreira, et al. *Leishmania*-infected MHC class IIhigh dendritic cells polarize CD4+ T cells toward a nonprotective T-bet+ IFN-gamma+ IL-10+ phenotype. J Immunol, v.191, n.1, Jul 01, p.262-73. 2013.

Reviewed Costa, J. M. L., A. C. R. Saldanha, et al. Clinical modalities, diagnosis and therapeutic approach of the tegumentary leishmaniasis in Brazil. Gazeta Medica da Bahia, v.79 n.(Supl.3), p.10-83. 2009.

Reviewed de Almeida, M.C., V. Vilhena, et al. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.98, n.7, p. 861-870. 2003.

Reviewed Kautz-Neu, K. K. Schwonberg, et al. Dendritic cells in *Leishmania major* infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. Med Microbiol Immunol. v.201, n.4, p.581-92. 2012.

Reviewed Moll, H. The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. Adv Exp Med Biol, v.479, p.163-73. 2000.

Reviewed Porfirio-Passos, G., P. M. A. Silva, et al. Métodos para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana - revisão. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer, Goiânia. 8: 1232-1248 p. 2012.

Reviewed Scott, P. e F. O. Novais. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. Nat Rev Immunol, v.16, n.9, Sep, p.581-92. 2016.

Ribeiro-De-Jesus, A., R. P. Almeida, et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. Braz J Med Biol Res, v.31, n.1, p.143-8. 1998.

Ridge, J. P., F. Di Rosa, et al. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. Nature, v.393, n.6684, Jun 4, p.474-8. 1998.

Rigano, R., B. Buttari, et al. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. Infect Immun, v.75, n.4, Apr, p.1667-78. 2007.

Roberts, C. B., J. A. Best, et al. Dendritic processing of excitatory synaptic input in hypothalamic gonadotropin releasing-hormone neurons. Endocrinology, v.147, n.3, Mar, p.1545-55. 2006.

Roberts, M. T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. Br Med Bull, v.75-76, p.115-30. 2005.

Rocha, R. D., C. M. Gontijo, *et al.* [Anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in american cutaneous leishmaniasis]. Rev Soc Bras Med Trop, v.35, n.6, Nov-Dec, p.551-62. 2002.

Romero, G. A., R. N. Sampaio, *et al.* Sensitivity of lymph node aspiration in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.94, n.4, p.509-11. 1999.

Rosenbaum, A. L., D. L. Phelps, *et al.* Retinal hemorrhage in retinopathy of prematurity associated with tocopherol treatment. Ophthalmology, v.92, n.8, p.1012-4. 1985.

Rutitzky, L. I., E. Ozkaynak, *et al.* Disruption of the ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway leads to enhanced hepatic immunopathology and increased gamma interferon production by CD4 T cells in murine schistosomiasis. Infect Immun, v.71, n.7, Jul, p.4040-4. 2003.

Sabin, E. A., M. I. Araujo, *et al.* Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. J Infect Dis, v.173, n.1, p.269-72. 1996.

Saenz, R. E., C. G. De Rodriguez, *et al.* Efficacy and toxicity of pentostam against Panamanian mucosal leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, v.44, n.4, Apr, p.394-8. 1991.

Sakthianandeswaren, A., J. M. Curtis, *et al.* Fine mapping of *Leishmania major* susceptibility Locus *Imr2* and evidence of a role for *Fli1* in disease and wound healing. Infect Immun, v.78, n.6, Jun, p.2734-44. 2010.

Salaiza-Suazo, N., P. Volkow, *et al.* Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. Trop Med Int Health, v.4, n.12, Dec, p.801-11. 1999.

Sanabria, M. X., D. A. Vargas-Inchaustegui, *et al.* Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection. Infect Immun, v.76, n.11, Nov, p.5100-9. 2008.

Santos Cda, S., V. Boaventura, *et al.* CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. J Invest Dermatol, v.133, n.6, Jun, p.1533-40. 2013.

Schriefer, A., M. E. Wilson, *et al.* Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis, v.21, n.5, Oct, p.483-8. 2008.

Sewell, D. L., E. K. Reinke, *et al.* Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. Immunol Lett, v.82, n.1-2, Jun 3, p.101-10. 2002.

Shi, L., Y. Zhou, *et al.* [Effect of *Schistosoma japonicum* Mr 22 600 particulated-antigen on dendritic cells and CD4+CD25+ regulatory T cells]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, v.28, n.3, Jun 30, p.161-5. 2010.

Schnorr, D. A.C, Muniz. *et al.* IFN-gamma production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. PLoS Negl Trop Dis. v.6, n.12, p. e1947. 2012.

Solbach, W. e T. Laskay. The host response to *Leishmania* infection. Adv Immunol, v.74, p.275-317. 2000.

Steinman, R. M., D. Hawiger, *et al.* Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol, v.21, p.685-711. 2003.

Straw, A. D., A. S. Macdonald, *et al.* CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. J Immunol, v.170, n.2, Jan 15, p.727-34. 2003.

Su, Z., M. Segura, *et al.* Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection. Infect Immun, v.73, n.6, Jun, p.3531-9. 2005.

Subramanian, G., J. W. Kazura, *et al.* B7-2 requirement for helminth-induced granuloma formation and CD4 type 2 T helper cell cytokine expression. J Immunol, v.158, n.12, Jun 15, p.5914-20. 1997.

Sun, X. J., R. Li, *et al.* Unique roles of *Schistosoma japonicum* protein Sj16 to induce IFN-gamma and IL-10 producing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in vitro and in vivo. Parasite Immunol, v.34, n.8-9, Aug-Sep, p.430-9. 2012.

Sunderkotter, C., M. Kunz, *et al.* Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. J Immunol, v.151, n.9, Nov 1, p.4891-901. 1993.

Szargiki, R., E. A. Castro, *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Parana, Brazil. Braz J Infect Dis, v.13, n.1, Feb, p.47-52. 2009.

Taylor, M. D., L. Legoff, *et al.* Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. J Immunol, v.174, n.8, Apr 15, p.4924-33. 2005.

Terrazas, C. A., L. Gomez-Garcia, *et al.* Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. Int J Parasitol, v.40, n.9, Aug 01, p.1051-62. 2010.

Terrazas, C. A., F. Sanchez-Munoz, *et al.* Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells. Int J Biol Sci, v.7, n.9, p.1391-400. 2011.

Thomas, P. G., M. R. Carter, *et al.* Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. J Immunol, v.171, n.11, Dec 1, p.5837-41. 2003.

Titus, R. G. e J. M. Ribeiro. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. Science, v.239, n.4845, p.1306-8. 1988.

Trinchieri, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu Rev Immunol, v.13, p.251-76. 1995.

Trottein, F., N. Pavelka, *et al.* A type I IFN-dependent pathway induced by *Schistosoma mansoni* eggs in mouse myeloid dendritic cells generates an inflammatory signature. J Immunol, v.172, n.5, Mar 1, p.3011-7. 2004.

Tsagozis, P., E. Karagouni, *et al.* Dendritic cells pulsed with peptides of gp63 induce differential protection against experimental cutaneous leishmaniasis. Int J Immunopathol Pharmacol, v.17, n.3, Sep-Dec, p.343-52. 2004.

Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, *et al.* Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. J Biol Chem, v.276, n.33, Aug 17, p.31332-9. 2001.

Van Der Kleij, D., A. H. Van Den Biggelaar, *et al.* Responses to Toll-like receptor ligands in children living in areas where schistosome infections are endemic. J Infect Dis, v.189, n.6, Mar 15, p.1044-51. 2004.

Van Zandbergen, G., N. Hermann, *et al.* *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. Infect Immun, v.70, n.8, Aug, p.4177-84. 2002.

Vargas-Inchaustegui, D. A., L. Xin, *et al.* *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. J Immunol, v.180, n.11, Jun 01, p.7537-45. 2008.

Vega-Lopez, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis, v.16, n.2, Apr, p.97-101. 2003.

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

Vouldoukis, I., P. A. Becherel, *et al.* Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human

macrophages by decreasing nitric oxide generation. Eur J Immunol, v.27, n.4, Apr, p.860-5. 1997.

Wang, M. L., Y. M. Cao, *et al.* Pre-existing *Schistosoma japonicum* infection alters the immune response to *Plasmodium berghei* infection in C57BL/6 mice. Malar J, v.12, Sep 14, p.322. 2013.

Weigle, K. A., M. De Davalos, *et al.* Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. Am J Trop Med Hyg, v.36, n.3, May, p.489-96. 1987.

Weirather, J. L., S. M. Jeronimo, *et al.* Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. J Clin Microbiol, v.49, n.11, Nov, p.3892-904. 2011.

Who. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis of WHO. 2017. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acessado em 17.01.2017.

Yamazaki, S., T. Iyoda, *et al.* Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. J Exp Med, v.198, n.2, Jul 21, p.235-47. 2003.

Yang, X. O., A. D. Panopoulos, *et al.* STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. J Biol Chem, v.282, n.13, Mar 30, p.9358-63. 2007.

Yoneda, T. [Relation between malnutrition and cell-mediated immunity in pulmonary tuberculosis]. Kekkaku, v.64, n.10, Oct, p.633-40. 1989.

Yoshida, A., H. Maruyama, *et al.* Immune response against protozoal and nematodal infection in mice with underlying *Schistosoma mansoni* infection. Parasitol Int, v.48, n.1, Mar, p.73-9. 1999.

Yurdakul, P. [Immunopathogenesis of *Leishmania* infections]. Mikrobiyol Bul, v.39, n.3, Jul, p.363-81. 2005.

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

Zheng, X., X. Hu, *et al.* Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response. J Neuroimmunol, v.194, n.1-2, Feb, p.107-14. 2008.

APÊNDICE

OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

1. **LOPES, DIEGO MOTA**; FERNANDES, JAMILLE SOUZA; CARDOSO, THIAGO MARCONI DE SOUZA; BAFICA, ALINE MICHELE BARBOSA; OLIVEIRA, **SÉRGIO COSTA**; CARVALHO, EDGAR M.; ARAUJO, MARIA ILMA; CARDOSO, LUCIANA SANTOS. Dendritic Cell Profile Induced by Antigen in Cutaneous Leishmaniasis Patients. *Biomed Res Int*, p. 1-10, **2014**;
2. FERNANDES, JAMILLE SOUZA; ARAUJO, MARIA ILMA; **LOPES, DIEGO MOTA**; SOUZA, ROBSON DA PAIXÃO DE; CARVALHO, EDGAR M.; CARDOSO, LUCIANA SANTOS. Monocyte Subsets in Schistosomiasis Patients with Periportal Fibrosis. *Mediators of Inflammation (Print)*, p. 1-12, **2014**;
3. DE ALMEIDA, TARCÍSIO VILA VERDE SANTANA; FERNANDES, JAMILLE SOUZA FERNANDES; **LOPES, DIEGO MOTA**; ANDRADE, LORENA SANTANA; OLIVEIRA, SÉRGIO COSTA; CARVALHO, EDGAR M.; ARAUJO, MARIA ILMA; CRUZ, ÁLVARO A.; CARDOSO, LUCIANA SANTOS. *Schistosoma mansoni* antigens alter activation markers and cytokine profile in lymphocytes of patients with asthma. *Acta Tropica*, v. 166, p. 268-279, **2016**;
4. KRUSCHEWSKY, RAMON DE ALMEIDA; CARDOSO, LUCIANA SANTOS; FERNANDES, JAMILLE SOUZA; SOUZA, ROBSON DA PAIXÃO DE; **LOPES, DIEGO MOTA**; CARVALHO, OTAVIO AUGUSTO MORENO DE; ARAUJO, MARIA ILMA. Immunological Profile in Individuals with Schistosomal Myeloradiculopathy. *Neuroimmunomodulation*, **2016**;

CAPÍTULO DE LIVRO ESCRITO DURANTE O DOUTORADO

1. Luciana Santos Cardoso; Jamille Souza Fernandes; Tarcísio Vila Verde Santana de Almeida; **Diego Mota Lopes**; Ricardo Riccio Oliveira; Maria Ilma Araujo. *SCHISTOSOMA MANSONI* INFECTION: IMMUNE RESPONSE ASSOCIATED TO PATHOGENESIS AND HOST PROTECTION. Livro: 25 ANOS DO PPGIM, **2016 IN PRESS**.

ANEXOS

ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAR DO ESTUDO

Nome do Projeto: Estudo do perfil de células dendríticas de pacientes com leishmaniose cutânea frente ao antígeno do *Schistosoma mansoni* rSm29.

Investigador Principal: Luciana Santos Cardoso, Farmacêutica, Pesquisadora do Serviço Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos – UFBA, Rua João das Botas s/n, Canela, CEP 40.110-160, Salvador-BA

Nome do

Paciente: _____

Convite e Objetivo:

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

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

Participação Voluntária:

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que lhe será prestada.

Finalidade do estudo:

Este estudo tem a finalidade de avaliar se a proteína do *S. mansoni* é capaz de prevenir o desenvolvimento de resposta inflamatória de células dendríticas na leishmaniose cutânea.

Procedimentos:

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

Duração do Estudo: Após a assinatura do termo de consentimento, sua participação no estudo terá uma duração máxima prevista de 12 meses.

Confidencialidade:

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

Análise dos Riscos e Benefícios:

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

Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:

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

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

Custos:

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

Esclarecimentos:

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam desse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dra. Luciana Santos Cardoso, coordenadora do projeto, pesquisadora do Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, João das Botas, s/n – Canela, telefone (071) 3237-7353, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Bahia- Rua Silveira Martins nº 2555- Cabula – Salvador/Bahia/Brasil – CEP. 41150-000. Tel. (71) 31172445.

Consentimento:

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

Assinatura do Participante ou Responsável

Assinatura do Pesquisador

Local: _____ Data ____/____/____ e Hora: _____

ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCL para menores

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE IDADE (MENORES DE 18), PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE

Projeto: Estudo do perfil de células dendríticas e linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea frente ao antígeno do *Schistosoma mansoni* rSm29.

Investigador Principal: Luciana Santos Cardoso, Farmacêutica, Pesquisadora do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia- Brazil.

Comitê de Ética: Universidade Estadual da Bahia- Rua Silveira Martins nº 2555- Cabula – Salvador/Bahia/Brasil – CEP. 41150-000. Tel. (71) 31172445.

Nome do paciente: _____

Número de Identificação no Projeto: _____

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

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

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

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

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

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

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

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

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

ANEXO III – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)
 AUTORIZAÇÃO: DECRETO Nº 92937/86 - RECONHECIMENTO: PORTARIA Nº 909/95, DOU 01.08.95

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PROCESSO NÚMERO	0603110287514
------------------------	---------------

TÍTULO DO PROJETO	Efeito dos antígenos de <i>Schistosoma mansoni</i> sobre a ativação das células dendríticas na leishmaniose cutânea.
RESPONSÁVEL	Luciana Santos Cardoso

OBJETIVO GERAL:

- Avaliar a capacidade do antígeno do *S. mansoni*, Sm29 e Sm22.6 em modular a ativação das células dendríticas derivadas de monócitos *in vitro* em indivíduos com leishmaniose tegumentar.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Em células dendríticas derivadas de monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar, avaliar *in vitro*:
- A capacidade dos antígenos Sm29 e Sm22.6 do *S. mansoni* em modular a ativação das células dendríticas na presença ou ausência do antígeno solúvel de Leishmaniose (SLA), através da expressão das moléculas de superfície HLA-DR, CD80 e CD86;
- A capacidade dos antígenos Sm29 e Sm22.6 do *S. mansoni* em modular a expressão de citocinas inflamatórias IL – 12 e TNF pelas células dendríticas;
- O efeito da adição dos antígenos Sm29 e Sm22.6 às culturas de células dendríticas estimuladas com antígeno solúvel de *L. braziliensis*, sobre a produção de IL-10 e expressão do receptor de IL -10;
- O perfil das citocinas IL-6, IL – 12 e TNF em sobrenadantes das culturas de células dendríticas estimuladas com os antígenos Sm29 e Sm22.6.

PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

No presente projeto será avaliado a capacidade do antígeno de *S. mansoni*, Sm29 e Sm22.6 em modular a ativação das células dendríticas por meio da realização da análise da frequência da expressão dos marcadores de superfície celular usando o programa "FlowJo". No presente estudo serão utilizados como marcadores de células dendríticas os anticorpos monoclonais: CD11c e CD1a, marcadores de ativação: CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), HLA-DR e marcadores das citocinas IL-10, IL-12, TNF e do receptor de IL-10 (IL-10R). Serão incluídos como sujeitos da pesquisa indivíduos residentes na área endêmica de Corte de Pedra com diagnóstico de leishmaniose cutânea, faixa etária de entre 10 a 60 anos; ambos os gêneros com parasitológico de fezes negativo para *S. mansoni* em pelo menos 3 amostras.

PARECER FINAL

Após a análise do projeto e observando o que dispõe a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde do Brasil, de outubro de 1996, declaramos que o projeto **Efeito dos antígenos de**

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação)



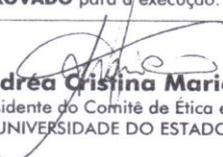
UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)

AUTORIZAÇÃO: DECRETO Nº 92937/86 - RECONHECIMENTO: PORTARIA Nº 909/95, DOU 01.08.95

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Schistosoma mansoni sobre a ativação das células dendríticas na leishmaniose cutânea encontra-se APROVADO para a execução.

Salvador, 16 de novembro de 2011


Andréa Cristina Mariano

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
da UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA- UNEB