

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU  
Mestrado em Ciências da Saúde

ESTUDO DE ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS EM  
CÉLULAS DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA NA  
INFECÇÃO POR *Leishmania (L.) chagasi*

**ANA PAULA VIEIRA MARCIANO**

Belo Horizonte - MG

Abril - 2006

Ministério da Saúde

**Fundação Oswaldo Cruz**

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde: sub-área Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DE ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS EM CÉLULAS DA  
IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA NA INFECÇÃO POR *Leishmania*  
*(L.) chagasi*

**Ana Paula Vieira Marciano**

*Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde na sub-área de Biologia Celular e Molecular.*

**Orientador:** *Dr. Olindo Assis Martins-Filho*

**Co-Orientadora:** *Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal*

*Laboratório de Doenças de Chagas*

Abril - 2006

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M319e  
2006

**Marciano, Ana Paula Vieira.**

Estudo de alterações fenotípicas em células da imunidade inata e adaptativa na infecção por *Leishmania (L.) chagasi* / Ana Paula Vieira Marciano.- Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Pesquisas René Rachou, 2006.

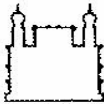
xii , 142 f.: il, 29,7 x 21,0 cm.

Bibliografia: f. 127 - 137

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

1. Imunofenotipagem 2. Citometria de fluxo 3. Leishmaniose visceral I. Título. II. Martins-Filho, Olindo Assis (Orientador); III. Peruhype-Magalhães, Vanessa Pascoal (Co-orientadora).

CDD – 22. ed. – 616.936 4



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Ata da vigésima quarta defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Ana Paula Vieira Marciano, sob a orientação do Dr. Olindo Assis Martins Filho e co-orientada pela Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal.**

Aos onze dias do mês de abril do ano de dois mil e seis, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da vigésima quarta dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A dissertação da aluna Ana Paula Vieira Marciano intitula-se "Estudo de alterações fenotípicas em células da imunidade inata e adaptativa na infecção por *Leishmania (L.) chagasi*". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Olindo Assis Martins Filho CPqRR/FIOCRUZ (orientador e presidente da banca), Dra. Ana Lúcia Teles Rabello - CPqRR(membro titular), Dra. Elenice Moreira Lemos - UFES (membro titular) e Dra Andréa Teixeira de Carvalho - CPqRR/FIOCRUZ (membro suplente). Após arguir a aluna e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada APROVADA. Uma vez encerrado o exame, eu, Olindo Assis Martins Filho, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, onze de abril de dois mil e seis.

Olindo Assis Martins Filho  
Dr. Olindo Assis Martins Filho

Ana Rabello  
Dra. Ana Lúcia Teles Rabello

Elenice Moreira Lemos  
Dra. Elenice Moreira Lemos

***À Cocota, vou sempre me lembrar da sua  
dança, seu riso e seu olhar...***

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Olindo Assis Martins Filho, por ter contribuído imensamente na minha formação profissional e pessoal, sempre me incentivando e acreditando em mim. Um exemplo de pessoa competente, profissional e, sobretudo, uma pessoa muito humana. Obrigada pela confiança e pela oportunidade!

À minha co-orientadora Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal, por toda ajuda e ensinamentos. Pela imprescindível contribuição e participação para a realização desse trabalho. E principalmente, pela amizade, carinho e confiança.

À Dra. Silvana Maria Elói Santos, pela agradável convivência, pelas importantes sugestões e pelo carinho.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira, pela colaboração nesse trabalho.

Ao Dr. Aluísio Prata, Dr. Sílvio Fernando Guimarães Carvalho e Dra. Ana Lúcia Teles Rabello, pela colaboração nesse trabalho.

À Renata, pelos valiosos conselhos, pela torcida nos momentos difíceis e, principalmente, por ter me ensinado o valor da amizade em nossa vida. Obrigada amiga!

À Joely pela grande amizade e pela importante contribuição na minha formação durante a iniciação científica.

À Danielle e ao Renato, pelos ensinamentos preciosos no citômetro e nas estratégias de análises, pela atenção e pelo incentivo sempre.

À Léia pelas preciosas sugestões, pelo apoio e atenção.

À Eliandra pela amizade, pela convivência alegre, pelas palavras de incentivo e pela grande ajuda.

À Roberta Félix e a Clari por tornarem o ambiente de trabalho mais alegre e por sempre estarem dispostas a nos atender.

À Bia e ao Márcio pela agradável convivência e disponibilidade.

A todos os amigos do Laboratório de Doença de Chagas, a grande família LADOC, pelo agradável convívio e aprendizado constante.

Aos amigos do laboratório de Imunologia, pela atenção com que sempre me receberam. Principalmente a Andréa, pela agradável convivência, pela ajuda técnica e ensinamentos no citômetro.

A Universidade Federal de Minas Gerais, pelos ensinamentos e pelo incentivo à busca da pós-graduação agora conquistada.

As grandes amigas Kádima, Carol e Hednamar por terem estado comigo em tantos momentos de minha vida e por participarem mesmo à distância de mais essa conquista.

Aos amigos da Pós-graduação, pelos momentos alegres.

Aos professores da Pós-graduação, por contribuir em minha formação junto à pesquisa.

A comissão de Pós-graduação - CPG, pela atenção.

A Cristiane, pela atenção e por ajudar na solução dos problemas.

À Ana Carolina Lustosa, na valiosa ajuda estatística dos dados.

Ao Segemar e ao Daniel, pela importante ajuda para a realização desse trabalho.

Aos funcionários do CPqRR, em especial a Cíntia e a Carla.

Aos pacientes, pela oportunidade de aprendizado.

À agência financiadora: René-Rachou/FIOCRUZ.

**Em especial:**

Aos meus pais, pelo exemplo de honestidade e trabalho. Pelo apoio constante. E por sempre me incentivarem na busca dos meus ideais.

Aos meus irmãos pela força, incentivo e grande ajuda.

A Deus, por colocar sempre no meu caminho, pessoas que contribuem para o meu crescimento como ser humano.

Meu sincero obrigada a todos!!!



***“Não se preocupe em entender. Viver ultrapassa todo entendimento”.***

*Clarice Lispector*

## RESUMO

Os estudos que avaliam a participação de eventos imunológicos associados à progressão e resistência nas Leishmanioses chamam a atenção para a necessidade de maiores investigações a fim de identificar a influência de variáveis-chaves no processo de categorização dos pacientes. Nesse trabalho analisamos características imunofenotípicas de leucócitos do sangue periférico de indivíduos portadores de LV clássica, indivíduos portadores de LV assintomática e indivíduos curados da LV, com ênfase em células envolvidas na resposta imune inata e adaptativa. Nossos resultados mostraram que os mecanismos imunológicos que acompanham a infecção humana por *Leishmania* e a cura após tratamento etiológico são constituídos de eventos complexos, multifatoriais que envolvem o estabelecimento concomitante de ativação e imunorregulação do compartimento da imunidade celular inata bem como aspectos fenotípicos sugestivos da ativação e co-estimulação paralela da imunidade adaptativa celular e humoral. Esse perfil complexo e, a princípio controverso, de alterações fenotípicas pode ser parcialmente esclarecido, quando consideramos a importância da análise das diversas formas clínicas da LV e o impacto da terapêutica específica. Nesse contexto, observamos um predomínio de alterações fenotípicas associadas a mecanismos de ativação e co-estimulação celular, tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa, favorecendo o estabelecimento e manutenção de doença ativa em indivíduos portadores de LV clássica. Destaca-se nestes indivíduos o papel de linfócitos T CD8 citotóxicos na manutenção e progressão da infecção, associado à presença de linfócitos B. Por outro lado, observamos que a terapêutica etiológica da LV, favorece à restauração, para níveis semelhantes aos observados em indivíduos não infectados, do número de células ativadas e expressando moléculas coestimuladoras no âmbito da imunidade inata e adaptativa, associada à presença de mecanismos imunorreguladores efetivos. Já na infecção assintomática, observamos a presença de um perfil fenotípico preservado. No compartimento da imunidade inata, observou-se um padrão fenotípico semelhante ao observado em indivíduos não infectados e uma diminuição no número de monócitos pró-inflamatórios. No âmbito da resposta imune adaptativa, observou-se a preservação de sinais fenotípicos de ativação celular em linfócitos T em associação à redução na participação de linfócitos B, compatível com a hipótese de ausência de manifestação sistêmica na infecção assintomática por *L. (L.) chagasi*. Em conjunto, nossos resultados demonstram a importância do estudo de aspectos imunológicos envolvidos às diversas formas clínicas da LV para melhor caracterização de eventos da resposta imune associados à progressão e à resistência da doença.

## ABSTRACT

Issues on immunological events associated with the progression and resistance to Leishmaniasis have been raised in further investigations in order to have key-variables correlated with the patients categorization. In the present work, immunophenotypic features of leukocytes of the peripheral blood from patients with classical visceral leishmaniasis (VL), asymptomatic individuals with VL, and VL cured individuals with emphasis on cells involved with innate and adaptive immune response were analyzed. Our results have shown that the immunological mechanisms following human *Leishmania* infection and its cure after the etiological treatment comprise complex multifactorial events, involving a concomitant establishment of activation and immunoregulation of the innate cellular immunity compartment as well as phenotypical aspects suggestive of activation and co-stimulation of cellular and humoral adaptive immunity. Such complex altered phenotypic profile, even causing controversy, might be partly cleared up when the importance of several VL clinical forms and the impact of a specific therapy are taken into account. In this scenario, predominant phenotypic alterations associated with mechanisms of cell activation and co-stimulation, in both innate and adaptive immune response, were observed enabling the establishment and maintenance of an active disease in individuals with classical VL. In such individuals, the role of T CD8 cytotoxic lymphocytes, in the maintenance and progression of VL infection associated with the presence of B lymphocytes, is outstanding. On the other hand, we have observed that, similar to what is observed in non-infected individuals, VL etiological therapy enables a re-establishment of the number of activated cells expressing co-stimulator molecules in innate and adaptive immunity associated with effective immunoregulation mechanisms. As for the asymptomatic infection, a preserved phenotypic profile was shown. In the innate immunity compartment, a phenotypic profile similar to that observed in non-infected individuals and a decreased number of pro-inflammatory monocytes were observed. Concerning adaptive immune response, there has been preservation of phenotypic signals of cellular activation in T lymphocytes correlated with a reduced participation of B lymphocytes, compatible with the hypothesis of an absent systemic manifestation in asymptomatic infection with *L. (L.) chagasi*. All together, our results have shown the importance of further investigation on immunological aspects involved with several VL clinical manifestations for a better characterization of the immune response events associated with the progression of and resistance to the disease.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	44
TABELA 2- ANTICORPOS MONOCLONAIS MARCADOS COM FLUOROCROMOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DE POPULAÇÕES E SUBPOPULAÇÕES CELULARES E MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE.....	46
TABELA 3- PERFIL HEMATOLÓGICO DOS LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NI, AS, ACT E CUR* .....	65

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA QUANTIFICAR O PERCENTUAL DE EOSINÓFILOS HLA-DR+, CD23+, CD28+ E CD86+ NO SANGUE PERIFÉRICO. ....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 2: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA QUANTIFICAR O PERCENTUAL DE NEUTRÓFILOS HLA-DR+ E CD28+ NO SANGUE PERIFÉRICO. ....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 3: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA QUANTIFICAR O PERCENTUAL DE NEUTRÓFILOS CD23+ NO SANGUE PERIFÉRICO. ....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 4: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA QUANTIFICAR O PERCENTUAL DE NEUTRÓFILOS CD86+ NO SANGUE PERIFÉRICO. ....</b>	<b>53</b>
<b>FIGURA 5: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA QUANTIFICAR O PERCENTUAL DE MONÓCITOS PRO-INFLAMATÓRIOS (HLA-DR++) NO SANGUE PERIFÉRICO. ....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 6: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA AVALIAR A EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS HLA-DR E CD86 EM MONÓCITOS E LINFÓCITOS B NO SANGUE PERIFÉRICO, RESPECTIVAMENTE.....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 7: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA QUANTIFICAR O PERCENTUAL DE MONÓCITOS CD23+ NO SANGUE PERIFÉRICO. ....</b>	<b>56</b>
<b>FIGURA 8: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA QUANTIFICAR O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD4+, LINFÓCITOS T CD4+HLA-DR+ E LINFÓCITOS T CD4+CD28+, NO SANGUE PERIFÉRICO. ....</b>	<b>57</b>
<b>FIGURA 9: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA QUANTIFICAR O PERCENTUAL DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B CD5+ OU CD5- E CD23+ NO SANGUE PERIFÉRICO. ....</b>	<b>58</b>
<b>FIGURA 10: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA QUANTIFICAR O PERCENTUAL DE CÉLULAS NK NO SANGUE PERIFÉRICO. ....</b>	<b>59</b>
<b>FIGURA 11: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA AS ANÁLISES DOS PERCENTUAIS DE CÉLULAS T REGULADORAS (CD4+CD25HIGH) POR CITOMETRIA DE FLUXO. ....</b>	<b>60</b>
<b>FIGURA 12: SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA QUANTIFICAR A EXPRESSÃO DA MOLÉCULA HLA-DR NA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS B NO SANGUE PERIFÉRICO. ....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 13: NÚMERO DE EOSINÓFILOS HLA-DR+/MM3, CD23+/MM3, CD28+/MM3 E CD86+/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-</b>	

<b>INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>67</b>
<b>FIGURA 14: NÚMERO DE NEUTRÓFILOS HLA-DR+/MM3, CD23+/MM3, CD28+/MM3 E CD86+/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>69</b>
<b>FIGURA 15: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA HLA-DR EM MONÓCITOS E NÚMERO DE MONÓCITOS CD23+/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>70</b>
<b>FIGURA 16: NÚMERO DE MONÓCITOS PRÓ-INFLAMATÓRIOS HLA-DR++/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>71</b>
<b>FIGURA 17: NÚMERO DE CÉLULAS NK/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>72</b>
<b>FIGURA 18: NÚMERO DE LINFÓCITOS T/MM3 (A), T CD4+/MM3 (B) E T CD8+/MM3 (C) NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>75</b>
<b>FIGURA 19: NÚMERO DE LINFÓCITOS T CD4+HLA-DR+/MM3 (A), LINFÓCITOS T CD8+HLA-DR+/MM3 (B) E LINFÓCITOS T CD4+CD28+/MM3 (C) NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>77</b>
<b>FIGURA 20: NÚMERO DE CÉLULAS T CD4+CD25HIGH/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>78</b>
<b>FIGURA 21: NÚMERO DE LINFÓCITOS B CD19+/MM3 (A), LINFÓCITOS B CONVENCIONAIS CD19+CD5-/MM3 (B) E LINFÓCITOS B1 CD19+CD5+/MM3 (C) NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>80</b>
<b>FIGURA 22: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA HLA-DR E CD86 EM LINFÓCITOS B NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).....</b>	<b>81</b>
<b>FIGURA 23: NÚMERO DE LINFÓCITOS B CD19+CD23+/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>82</b>

<b>FIGURA 24: RAZÃO ENTRE MONÓCITOS HLA-DR++ E LINFÓCITOS T CD8+HLA-DR+ NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>83</b>
<b>FIGURA 25: RAZÃO ENTRE MONÓCITOS HLA-DR++ E LINFÓCITOS B ATIVADOS CD19+CD23+ NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>84</b>
<b>FIGURA 26: RAZÃO ENTRE MONÓCITOS HLA-DR++ E LINFÓCITOS T CD4+CD25HIGH NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>85</b>
<b>FIGURA 27: RAZÃO ENTRE LINFÓCITOS T CD4+HLA-DR+/CD8+HLA-DR+ NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>87</b>
<b>FIGURA 28: RAZÃO ENTRE LINFÓCITOS T HLA-DR+ E LINFÓCITOS T CD4+CD25HIGH NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>88</b>
<b>FIGURA 29: RAZÃO ENTRE LINFÓCITOS T ATIVADOS (HLA-DR+) E LINFÓCITOS B ATIVADOS (CD19+CD23+) NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV ASSINTOMÁTICA (AS=) E PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=).</b> .....	<b>89</b>
<b>FIGURA 30: NÚMERO DE EOSINÓFILOS HLA-DR+/MM3, CD23+/MM3, CD28+/MM3 E CD86+/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>91</b>
<b>FIGURA 31: NÚMERO DE NEUTRÓFILOS HLA-DR+/MM3, CD23+/MM3, CD28+/MM3 E CD86+/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>93</b>
<b>FIGURA 32: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA HLA-DR EM MONÓCITOS E NÚMERO DE MONÓCITOS CD23+/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>95</b>
<b>FIGURA 33: NÚMERO DE MONÓCITOS PRÓ-INFLAMATÓRIOS HLA-DR++/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>95</b>
<b>FIGURA 34: NÚMERO DE CÉLULAS NK/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>97</b>

<b>FIGURA 35: NÚMERO DE LINFÓCITOS T/MM3 (A), T CD4+/MM3 (B) E T CD8+/MM3 (C) NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>98</b>
<b>FIGURA 36: NÚMERO DE LINFÓCITOS T CD4+HLA-DR+/MM3 (A), LINFÓCITOS T CD8+HLA-DR+/MM3 (B) E LINFÓCITOS T CD4+CD28+/MM3 (C) NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>100</b>
<b>FIGURA 37: NÚMERO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS CD4+CD25HIGH/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>101</b>
<b>FIGURA 38: NÚMERO DE LINFÓCITOS B CD19+/MM3 (A), B CONVENCIONAIS CD19+CD5-/MM3 (B) E LINFÓCITOS B1 CD19+CD5+/MM3 (C) NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>103</b>
<b>FIGURA 39: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA HLA-DR E CD86 EM LINFÓCITOS B NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>104</b>
<b>FIGURA 40: NÚMERO DE LINFÓCITOS B CD19+CD23+/MM3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=)</b> .....	<b>105</b>
<b>FIGURA 41: RAZÃO ENTRE MONÓCITOS HLA-DR++ E LINFÓCITOS T CD8+HLA-DR+ NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>106</b>
<b>FIGURA 42: RAZÃO ENTRE MONÓCITOS HLA-DR++ E LINFÓCITOS B ATIVADOS CD19+CD23+ NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>107</b>
<b>FIGURA 43: RAZÃO ENTRE MONÓCITOS HLA-DR++ E LINFÓCITOS T CD4+CD25HIGH NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>108</b>
<b>FIGURA 44: RAZÃO ENTRE LINFÓCITOS T HLA-DR+CD4+/CD8+HLA-DR+ CIRCULANTES NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>109</b>
<b>FIGURA 45: RAZÃO ENTRE LINFÓCITOS T HLA-DR+ E LINFÓCITOS T CD4+CD25HIGH NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>110</b>
<b>FIGURA 46: RAZÃO ENTRE LINFÓCITOS T ATIVADOS (HLA-DR+) E LINFÓCITOS B ATIVADOS (CD19+CD23+) NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (NI=), PORTADORES DE LV CLÁSSICA (ACT=) E CURADOS (CUR=).</b> .....	<b>111</b>
<b>FIGURA 47: PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS POR LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE</b>	



<b>INDIVÍDUOS PORTADORES DA LV CLÁSSICA E INDIVÍDUOS ASSINTOMÁTICOS. ....</b>	<b>116</b>
<b>FIGURA 48: PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS POR LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS PORTADORES DA LV CLÁSSICA E INDIVÍDUOS CURADOS. ....</b>	<b>121</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	Grupo com LV clássica
ALT	Alanina aminotransferase
APC	Célula apresentadora de antígeno
AS	Grupo com a forma assintomática da LV
AST	Aspartato aminotransferase
CD	Grupamento de diferenciação
CD3	Marcador de superfície celular da população de linfócitos T
CD4	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
CD5	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos B
CD8	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
CD14	Marcador de superfície celular da população de monócitos
CD16	Marcador de superfície celular da população de células NK
CD19	Marcador de superfície celular da população de linfócitos B
CD23	Receptor de baixa afinidade para IgE
CD25	Marcador de superfície celular da população de células T ativas, células B e monócitos
CD28	Marcador de superfície de células T, células B ativas
CD86	Marcador de superfície de monócitos, células B ativas e células dendríticas
CR1	Receptor 1 do complemento
CR3	Receptor 3 do complemento
CUR	Grupo curado da LV
CSFs	Fatores estimuladores de colônia
DCs	Células dendríticas
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fc	Fração cristalizável de imunoglobulinas
FcεRII	Receptor Fc para imunoglobulina E, também denominado CD23
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FSC	Forward Angle Light Scatter (Tamanho celular)
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
gp63	Glicoproteína 63 KD

HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulinas
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
KO	Knockout
LPG	Lipofosfoglicano
LSA	Antígeno solúvel de <i>Leishmania chagasi</i>
LV	Leishmaniose visceral
MFF	Solução fixadora
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NI	Grupo não infectado
NK	Célula Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAMP	Padrões moleculares associados à patógenos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PDP	Pesquisa direta de parasito
PE	Ficoeritrina
PMA	Acetato mirístico de forbol
PMN	Polimorfonuclear
OMS	Organização Mundial de Saúde
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RIO	Reativos intermediários do oxigênio
SSC	Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)
STAT-6	Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição 6
TCR	Receptor de Célula T
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral beta
Th1	Celulas T CD4 <sup>+</sup> secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2	Células T CD4 <sup>+</sup> secretoras do padrão 2 de citocinas

TNF- $\alpha$

Fator de necrose tumoral - alpha

ZM

Zona marginal

# SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>V</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>VI</b>
<b>EPIÍGRAFE.....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
2.1 - OBJETIVO GERAL .....	40
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>3- POPULAÇÃO E METODOLOGIA.....</b>	<b>41</b>
3.1- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	42
3.2- AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	44
3.3- AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DOS LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	45
3.4- ESTRATÉGIAS DE ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	46
3.4.1- <i>Estratégia de análise de eosinófilos HLA-DR+, CD23+, CD28+ e CD86+</i>	<i>48</i>
3.4.2- <i>Estratégia de análise de neutrófilos HLA-DR+ e CD28+</i> .....	<i>49</i>
3.4.3- <i>Estratégia de análise de neutrófilos CD23+</i> .....	<i>50</i>
3.4.4- <i>Estratégia de análise de neutrófilos CD86+</i> .....	<i>52</i>
3.4.5- <i>Estratégia de análise de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++)</i> .....	<i>53</i>
3.4.6- <i>Análise da densidade de expressão de HLA-DR em monócitos e expressão de CD86 em linfócitos B</i> .....	<i>54</i>
3.4.7 - <i>Estratégia de análise de monócitos CD23+</i> .....	<i>55</i>
3.4.8- <i>Estratégia de análise de linfócitos T (CD3+), linfócitos B (CD19+), células NK e das subpopulações de linfócitos T CD4+ (HLA-DR+ e CD28+) e CD8+ (HLA-DR+) e linfócitos B (CD5-, CD5+ e CD23+)</i> .....	<i>56</i>
3.4.9- <i>Estratégia de análise de células T reguladoras</i> .....	<i>59</i>
3.4.10- <i>Análise da densidade de expressão de HLA-DR em linfócitos B</i> .....	<i>60</i>
3.5- ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	62
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
I- ASPECTOS IMUNOFENOTÍPICOS ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR L. (L.) CHAGASI.....	66
4.1- CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS FENOTÍPICOS DE CÉLULAS ENVOLVIDAS NA IMUNIDADE INATA DE INDIVÍDUOS ASSINTOMÁTICOS E PORTADORES DE LV CLÁSSICA: ÊNFASE EM EOSINÓFILOS, NEUTRÓFILOS, MONÓCITOS E CÉLULAS NK.....	66
4.1.1- <i>Aspectos fenotípicos de eosinófilos circulantes</i> .....	<i>66</i>
4.1.1.1 - <i>Freqüência de eosinófilos HLA-DR+, CD23+,CD28+ e CD86+</i> .....	<i>66</i>

4.1.2 - Aspectos fenotípicos de neutrófilos circulantes.....	68
4.1.2.1- Frequência de neutrófilos HLA-DR+,CD23+,CD28+ e CD86+.....	68
4.1.3 - Aspectos fenotípicos de monócitos circulantes.....	70
4.1.3.1 – Densidade de expressão de HLA-DR em monócitos e frequência de monócitos CD23+ .....	70
4.1.3.2 - Frequência de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++).....	71
4.1.4 - Aspectos fenotípicos de células NK circulantes.....	72
4.1.4.1 - Frequência de células NK .....	72
4.2- CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS FENOTÍPICOS DE CÉLULAS ENVOLVIDAS NA IMUNIDADE ADAPTATIVA DE INDIVÍDUOS ASSINTOMÁTICOS E PORTADORES DE LV CLÁSSICA: ÊNFASE EM LINFÓCITOS T E LINFÓCITOS B.....	74
4.2.1 - Aspectos fenotípicos de linfócitos T circulantes.....	74
4.2.1.1 - Frequência de linfócitos T e subpopulações (linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+).....	74
4.2.1.2 - Frequência de linfócitos T ativados (CD4+HLA-DR+ e CD8+HLA-DR+) e de linfócitos T CD4+ expressando CD28.....	76
4.2.1.4 - Frequência de células T regulatórias (CD4+CD25HIGH).....	77
4.2.2 - Aspectos fenotípicos de linfócitos B circulantes.....	78
4.2.2.1 - Frequência de linfócitos B e subpopulações de linfócitos B (CD5- e CD5+).....	79
4.2.2.2 – Densidade de expressão de HLA-DR e CD86 em linfócitos B.....	80
4.2.2.3- Frequência de linfócitos B (CD19+CD23+).....	81
4.3- BALANÇO ENTRE OS PRINCIPAIS ASPECTOS DA NA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA DE INDIVÍDUOS ASSINTOMÁTICOS E PORTADORES DE LV CLÁSSICA.....	83
II - EFEITO DA TERAPÊUTICA ESPECÍFICA EM ASPECTOS IMUNOFENOTÍPICOS ASSOCIADOS À LV CLÁSSICA .....	90
4.4- CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS FENOTÍPICOS DE CÉLULAS ENVOLVIDAS NA IMUNIDADE INATA DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE LV CLÁSSICA E CURADOS: ÊNFASE EM EOSINÓFILOS, NEUTRÓFILOS, MONÓCITOS E CÉLULAS NK.....	90
4.4.1 - Aspectos fenotípicos de eosinófilos circulantes.....	90
4.4.1.1 - Frequência de eosinófilos HLA-DR+, CD23+,CD28+ e CD86+.....	90
4.4.2 - Aspectos fenotípicos de neutrófilos circulantes.....	91
4.4.2.1 - Frequência de neutrófilos HLA-DR+,CD23+,CD28+ e CD86+.....	92
4.4.3 - Aspectos fenotípicos de monócitos circulantes.....	94
4.4.3.1 – Densidade de expressão de HLA-DR em monócitos e frequência de monócitos CD23+ .....	94
4.4.3.2 - Frequência de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++).....	95
4.4.4 - Aspectos fenotípicos de células NK circulantes.....	96
4.4.4.1 - Frequência de células NK.....	96
4.5- CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS FENOTÍPICOS DE CÉLULAS ENVOLVIDAS NA IMUNIDADE ADAPTATIVA DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE LV CLÁSSICA E CURADOS: ÊNFASE EM LINFÓCITOS T E LINFÓCITOS B.....	97
4.5.1 - Aspectos fenotípicos de linfócitos T circulantes.....	97
4.5.1.1 - Frequência de linfócitos T e subpopulações (linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+).....	97
4.5.1.2 - Frequência de linfócitos T ativados (CD4+HLA-DR+ e CD8+HLA-DR+) e de linfócitos T CD4+ expressando CD28.....	99
4.5.1.4 - Frequência de células T regulatórias (CD4+CD25HIGH).....	100
4.5.2 - Aspectos fenotípicos de linfócitos B circulantes.....	101
4.5.2.1 - Frequência de população de linfócitos B e subpopulações de linfócitos B (CD5- e CD5+).....	102
4.5.2.2 – Densidade de expressão de HLA-DR e CD86 em linfócitos B.....	103

4.5.2.3 - Freqüência de linfócitos B (CD19+CD23+).....	104
4.6- BALANÇO ENTRE OS PRINCIPAIS ASPECTOS DA NA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA ASSOCIADOS AO TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA LV CLÁSSICA.....	106
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>112</b>
<b>6- COMENTÁRIOS.....</b>	<b>123</b>
<b>7- CONCLUSÃO.....</b>	<b>127</b>
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>138</b>
ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/FIOCRUZ.	139
ANEXO B - TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO PARA PACIENTES VOLUNTÁRIOS .....	141

Estudo de alterações fenotípicas em células da imunidade inata e adaptativa na  
infecção por *Leishmania (L.) chagasi*

---

1- INTRODUÇÃO



As leishmanioses referem-se a um espectro de doenças causadas por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. O complexo *donovani* compreende as espécies *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum* no Velho Mundo e *Leishmania (L.) chagasi* nas Américas. As leishmanias são transmitidas pela picada de fêmeas de insetos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo e são parasitos intracelulares obrigatórios que se reproduzem por divisão binária, dentro do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos suscetíveis (LAINSON et al. 1987).

As leishmanioses são clinicamente divididas em visceral e tegumentar (cutânea, mucocutânea e difusa) e estão entre as dez endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde (OMS), devido ao seu caráter endêmico em 88 países de várias regiões do mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais das Américas, África, Ásia e Europa. Estima-se que aproximadamente 12 milhões de pessoas estejam atualmente infectadas e que cerca de 367 milhões encontrem-se em risco para adquirir a doença, estando a incidência anual estimada em cerca de 1–1,5 milhões de casos para a leishmaniose tegumentar e 500.000 casos para a leishmaniose visceral (OMS, 2003).

Nas Américas, a leishmaniose visceral (LV) humana ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo que 90% dos casos são registrados no Brasil, onde está distribuída em 19 das 27 unidades federativas, atingindo 4 das 5 regiões brasileiras. Sua maior prevalência encontra-se na região nordeste a qual, concentra cerca de 66% dos casos. No Brasil, registra-se em média cerca de 3.700 casos de LV por ano e a incidência é de dois casos/100.000 habitantes. Embora a *L. (L.) chagasi* possa acometer indivíduos de qualquer faixa etária, a doença é mais freqüente em crianças menores de 10 anos (54,4%). O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%), e a letalidade está em torno de 8%, o que corresponde a uma média de 230 óbitos por ano (Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, 2003).

A epidemiologia da LV vem se alterando através do tempo. Até a década de 80, a maioria dos casos concentrava-se nas áreas rurais dos municípios, aos poucos a doença veio adquirindo característica periurbana e atualmente, encontra-se em plena urbanização, estando presente em bairros de grandes cidades, como Campo Grande - MS, Teresina - PI, São Luís - MA, Belo Horizonte - MG e um grande número de localidades no interior do país. Essa mudança na distribuição da LV

---

parece ser consequência de processo multifatorial. Acredita-se que um dos mais relevantes seja a participação do cão como reservatório doméstico da LV, assim como a adaptação do hospedeiro invertebrado, *Lutzomyia longipalpis*, ao ambiente peridomiciliar, além do aumento dos casos de co-infecção HIV-*Leishmania* (FUNASA, 2003).

O controle da LV está diretamente associado à redução dos casos humanos e caninos, e consiste basicamente no tratamento de todos os casos humanos, na eliminação dos reservatórios domésticos, o que resulta na quebra do elo de transmissão da antropozoonose, no combate ao vetor e, numa rigorosa vigilância epidemiológica (FUNASA, 2003).

A propagação e a manutenção da doença estão associadas às condições precárias, sem qualquer infra-estrutura de saneamento básico, em que vivem populações carentes, à grande convivência com animais domésticos e ao insucesso de algumas medidas anti-vetoriais. Neste contexto, a infecção ocorre quando formas promastigotas infectantes são inoculadas no tecido do hospedeiro (homem ou cão), durante o repasto sangüíneo do inseto vetor. Neste momento, os parasitos são internalizados por células fagocitárias, predominantemente macrófagos. Este processo envolve ligação de moléculas de superfície dos parasitos entre elas, o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 KD (gp 63), a receptores expressos na superfície de macrófagos, incluindo os receptores 1 e 3 do complemento (CR1 e CR3), receptor manose-fucose e receptor de fibronectina (BRITTINGHARM et al. 1995; GREEN et al. 1994). No macrófago, os parasitos perdem o flagelo, tornando-se arredondados ou ovóides e são então denominados amastigotas, formas que residem no interior dos fagolisossomos, onde sobrevivem e se multiplicam. Alguns macrófagos infectados se rompem e liberam as amastigotas, que são então internalizadas por macrófagos vizinhos. Durante um novo repasto sangüíneo, o inseto vetor ingere macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania*, que são levadas ao intestino, onde se transformam em promastigotas e se multiplicam. Quando o inseto exerce novo hematofagismo, formas infectantes são inoculadas, reiniciando assim, o ciclo no hospedeiro vertebrado.

Do ponto de vista clínico, a LV pode ser dividida, conforme as características clínicas e laboratoriais apresentadas pelos pacientes, em quatro formas: (1) assintomática, (2) subclínica ou oligossintomática com progressão para cura, (3) subclínica ou oligossintomática com progressão para a forma clássica e a (4) clássica. Essa caracterização baseou-se num estudo clínico e epidemiológico com

---

crianças sorologicamente positivas, residentes em Jacobina – BA (BADARÓ et al. (1986a e b).

(1) Assintomática

Caracterizada por ausência de manifestações clínicas (sinais e sintomas) na anamnese e no exame físico e, teste de hipersensibilidade tardia (Teste de Montenegro) positivo na maioria dos casos. Nas análises de parâmetros laboratoriais, observa-se hemograma normal, provas de função hepática (dosagem das transaminases ALT e AST) normais e eletroforese de proteínas do soro dentro dos padrões de normalidade.

(2) Subclínica ou Oligossintomática com progressão para cura

Caracterizada pela presença de sintomas leves como diarreia, mal estar e febre baixa, com discreta visceromegalia. Em geral, o baço não é palpável e o fígado está pouco aumentado. O Teste de Montenegro em muitos casos está positivo. Nas análises de parâmetros laboratoriais, observa-se hemograma normal, provas de função hepática pouco alteradas e eletroforese de proteínas normal.

(3) Subclínica ou Oligossintomática com progressão para a forma Clássica

Neste caso, os pacientes apresentam febre, tosse seca, diarreia e mal estar. Em todos os casos ocorre visceromegalia de baço e fígado. O Teste de Montenegro é negativo e a detecção do parasito em aspirados de medula óssea é freqüente. Nas análises de parâmetros laboratoriais, observa-se discreta leucopenia, ALT permanece normal e os valores de AST encontram-se um pouco elevados. Já a eletroforese de proteínas apresenta discreta inversão na relação albumina/gama-globulinas.

(4) Clássica

Doença de instalação insidiosa e evolução prolongada, caracterizada por febre irregular, diarreia, tosse seca e mal estar. O abdômen aparece muito protuso em decorrência da hepatoesplenomegalia. A pele mostra-se de coloração pardacenta. Ocorre desnutrição protéico-calórica e os cabelos ficam quebradiços. Há emagrecimento progressivo levando o indivíduo à caquexia. O Teste de Montenegro está negativo. Nas análises de parâmetros laboratoriais, observa-se completa inversão na relação albumina/gama-globulinas, pancitopenia e provas de função hepática bastante alteradas.

Estas formas clínicas da LV refletem o equilíbrio entre a multiplicação dos parasitos nas células do sistema fagocítico mononuclear, a resposta imune do indivíduo e as alterações degenerativas resultantes desse processo.

É sabido que as leishmanioses representam um excelente modelo sistêmico para estudo da resposta imune mediada por células. Em 1986, MOSMANN et al. iniciaram uma revolução conceitual na imunologia por dividirem as células T “helper” (Th) em duas populações (Th1 e Th2) com perfil de citocinas antagônicas e contra-reguladoras. Este novo paradigma foi então entusiasticamente adotado em diversas áreas da imunologia e de doenças infecciosas, sendo a primeira demonstração direta de sua relevância na regulação do curso de doenças *in vivo*, identificada a partir de estudos em modelo experimental de infecção com *Leishmania major* (LOCKSLEY et al. 1987). Os pesquisadores descreveram que a predisposição genética para suscetibilidade ou resistência à infecção de camundongos por *L. major*, correlacionava-se com um predomínio de resposta imune Th2 ou Th1, respectivamente. Entretanto, atualmente, tem-se questionado a simplicidade deste modelo. Dados recentes revelam a existência de complexidades na regulação de citocinas e nos mecanismos de aquisição de resistência ou suscetibilidade.

A infecção por *L. major* em camundongos BALB/c leva, invariavelmente, a um crescimento descontrolado do parasito no sítio primário de infecção e sua subsequente disseminação para linfonodos, baço, fígado, medula óssea e outros sítios cutâneos. Existe um consenso de que a inabilidade dos camundongos BALB/c em controlar a infecção esteja associada à elevada e sustentada resposta Th2, caracterizada pela rápida expansão da população de células T CD4<sup>+</sup> com receptor (TCR) V $\alpha$ 8<sup>+</sup>V $\beta$ 4<sup>+</sup>, que reconhece um antígeno de *Leishmania* homólogo de receptores para quinase C ativada-LACK e produzem IL-4 (JULIA et al. 1999). Além disso, tem sido descrito que certas cepas de *L. major* levam à infecção não-limitante em BALB/c IL-4 “Knockout” (KO). Como a IL-13 divide muitas funções biológicas com a IL-4, incluindo o uso do IL-4R $\alpha$  e a sinalização dependente de STAT-6, parece, que esta citocina, pode efetivamente cooperar com ou substituir a IL-4 promovendo diferenciação Th2 e suscetibilidade à infecção por *L. major* em BALB/c (MATTHEWS et al. 2000), embora estudos com camundongos KO para IL-4R $\alpha$ , demonstrem que ocorre manutenção do fenótipo não-limitante com algumas cepas de *L. major*, sugerindo a participação de outras citocinas além da IL-4 e da IL-13, neste fenômeno. As descobertas de que camundongos KO para IL-4R $\alpha$  e IL-10, são altamente resistentes à infecção por *L. major*, identificaram a IL-10 como a citocina que, pelo menos em alguns casos seria necessária para promover a suscetibilidade (NOBEN-TRAUTH et al. 2003). Outro fator que também está associado à suscetibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major*, se refere ao

---

aumento da expressão de CD86, que especificamente é um co-estímulo para a produção de IL-4 e proliferação de células Th2 (RANGER et al. 1996).

Embora a imunidade adaptativa venha sendo extensivamente estudada no modelo de infecção por *Leishmania*, trabalhos recentes abordando a defesa do hospedeiro contra diversos patógenos, têm demonstrado que as células da resposta imune inata apresentam um importante papel não apenas nos mecanismos de destruição inicial do patógeno, mas também no direcionamento do tipo de resposta imune específica gerada. Tem sido descrito que nas primeiras 48-72 horas após inoculação de *L. major*, um intenso infiltrado polimorfonuclear (PMN) é direcionado para o sítio da lesão. Em camundongos BALB/c, os neutrófilos são as células predominantes nos primeiros 3 dias após infecção, acompanhados de um discreto infiltrado de eosinófilos (ANDRADE et al. 1984; BEIL et al. 1992). Após análises histopatológicas, observou-se a presença de parasitos íntegros e destruídos no interior de neutrófilos e também de eosinófilos, sugerindo a participação destas células no controle inicial da infecção (LIMA et al. 1998). Seguindo a internalização das leishmanias, estas seriam destruídas por mecanismos leishmanicidas, tais como, a produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio (OLIVEIRA et al. 1997 e 1998; WITKO-SARSAT et al. 2000). Entretanto, tem sido descrito que, em camundongos suscetíveis, os neutrófilos não estão necessariamente envolvidos na destruição dos parasitos, podendo funcionar como reservatórios para liberação tardia da *Leishmania*. AGA et al. (2002), demonstraram que a *Leishmania* interfere no tempo de sobrevivência dos neutrófilos via mecanismo, envolvendo a inibição da ativação da caspase 3, enzima intimamente relacionada aos mecanismos apoptóticos. A proporção de neutrófilos em infiltrados inflamatórios em BALB/c passa de 90% no primeiro dia, para 50% do infiltrado celular após 3 dias da infecção, sendo persistente até o 8º dia da infecção (BEIL et al. 1992). Neste contexto, os autores sugerem que o neutrófilo promove um nicho de sobrevivência inicial para a *Leishmania*. Com a chegada dos macrófagos ao foco inflamatório, ocorre interação destas células com os neutrófilos que tardiamente entram em apoptose. Estes seriam, então, fagocitados, sem ativar mecanismos microbicidas, o que poderia ser uma das formas de entrada silenciosa do parasito na célula alvo (AGA et al. 2002). Quanto ao papel das células “Natural Killer” (NK) na infecção experimental por *L. major*, ainda existem controvérsias. SCHARTON-KERSTEN et al. (1995 e 1997), descreveram que as células NK são fundamentais no direcionamento da resposta Th1 na infecção por *L. major*, uma vez que esta

população celular representa uma importante fonte de IFN- $\gamma$ . Além disso, eles demonstraram que a ativação dessas células, incluindo ativação de funções citotóxicas, parece estar comprometida em camundongos suscetíveis.

Ao contrário das dificuldades em se caracterizar a resposta imune envolvida na suscetibilidade, os mecanismos de resistência à infecção já são bem estabelecidos. Consistente com o conceito de resposta Th1 como mediadora de proteção, camundongos C57BL/6, geneticamente resistentes à infecção por *L. major*, apresentam aumento nos níveis de citocinas fundamentais na ativação de funções efetoras e na diferenciação de células Th1, tais como, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 (SWIHART et al. 1995). Além disso, outros fatores somados ao microambiente de citocinas, são importantes. Os mecanismos de co-estimulação via CD40-CD40L, são essenciais para a produção de IL-12 (CAMPBELL et al. 1996). É interessante que, no modelo de resistência à infecção, além das células T CD4<sup>+</sup>, também as células T CD8<sup>+</sup> são requeridas durante o controle primário da infecção com *L. major* na pele (BELKAID et al. 2002). Embora seja descrito que a principal função protetora das células T CD8<sup>+</sup> é contribuir para a liberação de IFN- $\gamma$  no sítio de infecção, esta população celular também está envolvida na citólise das células infectadas (TSAGOZIS et al. 2003).

Diferente do descrito para camundongos BALB/c, na infecção em C57BL/6, as células da resposta imune inata têm um importante papel como células efetoras por reduzirem o número de parasitos no sítio de inoculação e controlarem a disseminação sistêmica inicial da *Leishmania*, protegendo o hospedeiro antes do completo desenvolvimento da resposta imune específica. O infiltrado neutrofílico representa 60% das células presentes no sítio de infecção, caindo para 10% após 3 dias. Em C57BL/6, os neutrófilos são mais eficientes na destruição da *Leishmania*, sendo o ambiente de citocinas, um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento eficaz de controle do parasitismo (TACCHINI-COTTIER et al. 2000). Os eosinófilos representam 15% do infiltrado inflamatório e a destruição da *Leishmania* por estas células é dependente da ativação de mecanismos leishmanicidas via IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5 (BEIL et al. 1992; OLIVEIRA et al. 1997 e 1998; WATANABE et al. 2004). Já as células NK aparecem no sítio de infecção 24h após inoculação do parasito. As células NK são componentes da resposta imune inata e têm sido associadas ao desenvolvimento de resposta imune Th1, especialmente pela capacidade dessas células em produzir IFN- $\gamma$ , a qual pode otimizar a produção de IL-12 por APC e a expressão de IL-12R por células T ativadas (SCHARTON et al.

1993). Além disso, estas células exercem uma potente atividade citotóxica contra células infectadas (MULLER et al. 2001).

Apesar da resposta imune na leishmaniose experimental ser extensivamente estudada em modelos de infecção por *L. major*, a natureza da imunidade na LV, que é diferente do modelo cutâneo em diversos aspectos, tem sido pouco explorada. Entretanto, alguns estudos têm utilizado camundongos BALB/c como modelo para a infecção visceral causada por *L. (L.) donovani*. Embora estes camundongos sejam considerados suscetíveis, apresentando doença progressiva durante as duas primeiras semanas após infecção, ela é controlada pela resposta imune do hospedeiro. Assim, o modelo de infecção em camundongo tem sido comparado aos casos de infecção oligossintomática com progressão para cura descrita em humanos sendo, então, considerado um modelo de estudo de resposta imune protetora ou de resistência.

Vários estudos abordando a infecção visceral em BALB/c, demonstraram que no fígado, ocorre multiplicação dos parasitos inicialmente nas células de Kupffer que provavelmente ativam linfócitos T  $\gamma\delta^+$  e células NKT (CRISPE et al. 1996; BENDELAC et al. 1997). Estas células seriam responsáveis pela rápida cinética de produção de citocinas e quimiocinas essenciais para o recrutamento dos linfócitos T  $\alpha\beta^+$  ativados no baço e para formação do granuloma (COTTERELL et al. 1999; ENGWERDA et al. 1996). As amastigotas crescem rapidamente nas primeiras duas semanas de infecção, sendo que o pico de crescimento dos parasitos coincide com a maior expressão das citocinas IL-4 e IL-10 (MIRALLES et al. 1994). A partir da quarta semana, observa-se um declínio na carga parasitária promovida pela ação da resposta imune adquirida que favorece a destruição eficiente dos parasitos. A morte dos parasitos e o desenvolvimento de imunidade são dependentes da formação do granuloma ao redor das células de Kupffer infectadas. O desenvolvimento do granuloma requer ambos linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  em associação aos monócitos sangüíneos, bem como às citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 (MURRAY et al. 1992 e 1997), sendo a resistência hepática diretamente relacionada à expressão do gene para NOS2 e a geração de NO por macrófagos (MURRAY et al. 1999). Já o papel dos linfócitos B ou das imunoglobulinas na imunidade na LV não foi ainda suficientemente avaliado. Recentemente, SMELT et al. (2000) demonstraram que camundongos deficientes de linfócitos B são altamente resistentes à infecção por *L. (L.) donovani*, e esta resistência está associada à formação de granuloma maduro e bem organizado neste órgão.

À medida que a carga parasitária no fígado diminui, ocorre um aumento no baço, sendo a infecção hepática resolvida em 8 a 12 semanas. No baço, observa-se infecção persistente e a expansão dos parasitos associa-se ao aumento da atividade hematopoiética local, dirigida por fatores estimuladores de colônia (CSFs) (COTTERELL et al. 2000). O baço então, torna-se o local de infecção crônica onde há destruição de muitas células dendríticas foliculares com concomitante perda dos centros germinativos, associados à elevada infiltração de macrófagos parasitados (SMELT et al. 1997). Observa-se prejuízo funcional de células dendríticas, correlacionado com redução da expressão de MHC-II de superfície, diminuição da produção de IL-12 e diminuição da capacidade destas células em ativar células T a produzirem IFN- $\gamma$ . Também os macrófagos da ZM (Zona Marginal) infectados podem favorecer a desativação de linfócitos T e, conseqüentemente, a sobrevivência dos parasitos (KAYE et al. 1995; SAITO et al. 1998). Foi descrito que os macrófagos da ZM secretam altos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  e baixos níveis de IL-12 e NO. Após duas semanas de infecção a produção de IL-10 na ZM e de TGF- $\beta$  na polpa vermelha é proeminente. A produção dessas citocinas pode favorecer o estabelecimento da infecção, uma vez que suprimem a resposta de IFN- $\gamma$  e a ativação de mecanismos leishmanicidas de macrófagos (MELBY et al. 2001a).

Apesar das alterações imunopatológicas observadas no baço dos camundongos infectados, a partir da 8ª semana da infecção, observa-se ativação de mecanismos reguladores, que induzem o controle na replicação da *Leishmania*. Este controle associa-se ao aumento do número de LT ativados, especialmente LT CD8<sup>+</sup>, produtores de IFN- $\gamma$ . Estas células, além de exercerem função citotóxica sobre as células alvo, podem através da liberação de IFN- $\gamma$ , promover ativação “bystander” de macrófagos que passam a apresentar atividade leishmanicida (TSAGOZIS et al. 2003). Dessa forma, o baço torna-se um local de infecção crônica, onde a carga parasitária residual pode ser mantida por toda a vida do animal.

Estudos avaliando o papel das células da resposta imune inata no controle da infecção visceral, assim como descrito para o modelo de infecção cutânea, têm sido pouco explorados. ROUSSEAU et al. (2001), descrevem a presença de neutrófilos no fígado e no baço de camundongos infectados por *L. (L.) infantum* poucas horas após infecção. O papel dessas células no controle inicial da multiplicação das leishmanias tem sido demonstrado utilizando-se modelos experimentais, nos quais os neutrófilos foram eliminados. Os autores demonstraram que o baço seria o órgão mais comprometido pela ausência dos neutrófilos (ROUSSEAU et al. (2001).



Entretanto, a presença de neutrófilos no granuloma hepático, sugere que essas células possam contribuir tanto no processo patológico da inflamação, quanto no controle dos parasitos. Dados recentes sugerem que um dos mecanismos pelos quais os neutrófilos podem controlar a infecção por *L. (L.) donovani* é através da produção de reativos intermediários do oxigênio (RIO) que têm um importante papel na destruição inicial do parasito e no recrutamento de fagócitos mononucleares (MURRAY et al. 1999). A produção dos RIO por neutrófilos é regulada por TNF- $\alpha$ , e sabe-se que células produtoras de TNF- $\alpha$  são recrutadas para o fígado dentro de 3 dias após infecção por *L. (L.) donovani* (ENGWERDA et al. 1996). Já o papel das células NK é melhor caracterizado. Parece que estas células são inicialmente ativadas no baço, assim como os linfócitos T que migram para o fígado, onde participam dos mecanismos iniciais de regulação da infecção por serem importante fonte de IFN- $\gamma$ .

Como descrito acima, o estudo da LV em camundongo, representa um bom modelo para avaliação de resposta imune protetora. No entanto, o melhor modelo para o estudo da doença progressiva é o hamster que apresenta infecção sistêmica tanto com *L. (L.) donovani* quanto com *L. (L.) chagasi*. Estes animais desenvolvem um quadro clínico-patológico similar à LV clássica em humanos, com hepatoesplenomegalia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia (GIFAWESSEN et al. 1989; PEARSON et al. 1990).

Hamsters infectados com promastigotas por via endovenosa, apresentam aumento progressivo da carga parasitária no baço, fígado e medula óssea. Em geral, observa-se expressão de mRNA para citocinas dos tipos 1 e 2, tais como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 e TGF- $\beta$  no baço, fígado e medula óssea, sendo a expressão mais proeminente no baço. Não se observa aumento na expressão de mRNA para IL-4 em resposta à infecção. Já os níveis de expressão de mRNA para TNF- $\alpha$  apresentam um aumento de 50 vezes após 28 dias da infecção, sugerindo a participação dessa citocina na progressão da doença (MELBY et al. 2001b). Apesar da doença progressiva na LV experimental ocorrer na presença de uma elevada expressão de mRNA para IFN- $\gamma$ , não se observa expressão de mRNA para NOS2 ou para o NO ativo no fígado e no baço dos hamsters infectados, o que indica a ausência de ativação de mecanismos leishmanicidas de macrófagos e consequentemente da destruição dos parasitos. Os altos níveis de expressão de IL-10 e TGF- $\beta$ , citocinas conhecidas por suprimirem ativação de macrófagos e expressão de NOS2, sugerem a participação dessas citocinas na patogênese da

infecção. Estas seriam responsáveis pela inibição da ativação de macrófagos mediada por IFN- $\gamma$  (MELBY et al. 2001b). Estudos mostrando as origens celulares envolvidas na produção dessas citocinas, incluindo células da imunidade inata e adaptativa, e estudos dos mecanismos envolvidos na diferenciação de resposta imune apresentado por estes animais, precisam ser mais explorados e melhor compreendidos.

Em seres humanos, a LV é caracterizada como um protótipo de disfunção imunológica específica. Os mecanismos imunológicos envolvidos na infecção em humanos e suas relações com as formas clínicas da doença desenvolvidas após infecção, têm sido abordados por meio de avaliações do perfil imunofenotípico e de produção de citocinas.

Imunologicamente, a forma clínica assintomática tem sido caracterizada pela presença de resposta proliferativa e produção de IFN- $\gamma$  em culturas de células estimuladas com LSA (CARVALHO et al. 1992). Trabalhos utilizando estimulação com antígenos recombinantes, também têm demonstrado o aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  no sobrenadante das culturas (COSTA et al. 1999). Entretanto, CARVALHO et al. (2003), demonstraram que a estimulação de PBMC de indivíduos assintomáticos com uma proteína recombinante de *L. (L.) infantum*, a KMP-11Kda, embora não altere os níveis de IFN- $\gamma$ , induz aumento na produção de IL-10. Eles sugerem que o desenvolvimento de uma resposta imune modulada seja importante para se obter uma inibição eficiente do estabelecimento da infecção nestes indivíduos. MARY et al (1999) avaliando o perfil de linfócitos T e de produção de citocinas de células em indivíduos assintomáticos, infectados com *L. (L.) infantum* mostraram que após estimulação inespecífica, cerca de 20 a 60% dos clones de LT, apresentavam fenótipo CD8<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4. Observou-se também que os clones de LT CD4<sup>+</sup> produziam IFN- $\gamma$  e IL-4. Por outro lado, estudos com células de indivíduos infectados com *L. (L.) chagasi*, demonstraram que após estimulação inespecífica, 95% dos linfócitos T apresentavam fenótipo CD4<sup>+</sup> e produziam apenas altos níveis de IFN- $\gamma$  (HOLADAY et al. 1993a).

Quanto à infecção ativa, tem-se demonstrado, que linfócitos de indivíduos com LV clássica não proliferam *in vitro* na presença de LSA. Além disso, citocinas como IL-2, responsável pela indução de resposta proliferativa de linfócitos, e IL-12, principal citocina envolvida na ativação e diferenciação de linfócitos T e células NK em células produtoras de IFN- $\gamma$ , fundamental na ativação de mecanismos

leishmanicidas de macrófagos, não foram detectadas no sobrenadante de cultura de PBMC de indivíduos com LV clássica (CARVALHO et al. 1985, 1992 e 1994; GHALIB et al. 1995; CILLARI et al. 1995). Em contraste, os níveis de IL-10 e também em alguns casos de IL-4, encontraram-se elevados no sobrenadante de culturas de PBMC, não estimuladas e estimuladas com LSA (HOLADAY et al. 1993a e 2000; RAZIUDDIN et al. 1994). Estas citocinas podem apresentar efeito sinérgico na inibição da produção de IFN- $\gamma$  e proliferação de linfócitos. Entretanto, a IL-4 sozinha não teve efeito sobre o controle da resposta Th1 e da proliferação de linfócitos observada na LV clássica, uma vez que a adição de anticorpos anti-IL-4 às culturas, não restaurou a resposta proliferativa ou a produção de IFN- $\gamma$  nestes indivíduos. Já a adição de anti-IL-10, favoreceu o restabelecimento das funções normais das células (CARVALHO et al. 1994). A IL-10 parece então, ser a principal citocina envolvida na regulação da resposta imune efetora contra a infecção. O principal mecanismo regulador envolvido seria o efeito desativador de macrófagos. A IL-10 pode estar relacionada à inibição da produção de IL-12, diminuição da expressão de moléculas do complexo MHC-II e de moléculas B7 envolvidas na co-estimulação celular, na superfície dos macrófagos. A IL-10 poderia ainda, favorecer a diferenciação da resposta imune adquirida para um perfil tipo 2, a inibição da proliferação de linfócitos e a inibição da produção de IFN- $\gamma$  por estas células (BOGDAN et al. 1991; FIORENTINO et al. 1991a e b; TAGA et al. 1992). Estudos avaliando a frequência e o padrão de produção de citocinas por clones de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> estimulados com LSA, demonstraram que indivíduos com LV clássica apresentavam aumento na frequência de células T ativadas (LT HLA-DR<sup>+</sup>), onde 90 a 100% das células T tinham fenótipo CD8<sup>+</sup> e seriam as células responsáveis pelo aumento da IL-10 observado nesta forma clínica da LV (CENINI et al. 1993; HOLADAY et al. 1993a e 2000).

Apesar da estimulação antígeno-específica promover o direcionamento da resposta imune para um perfil tipo 2, em culturas submetidas ao estímulo inespecífico com PHA, tem-se observado aumento nos níveis de citocinas inflamatórias e reguladoras, como IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  e proliferação linfocitária (RAZIUDDIN et al. 1994). Além disso, num estudo de avaliação do perfil de citocinas intracelulares de PBMC de um indivíduo com LV clássica, estimuladas com PMA, foi descrita a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> co-expressando IFN- $\gamma$  e IL-10 (LAGLER et al. 2003).

Após a cura, observam-se a restauração da resposta linfoproliferativa com aumento significativo no número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (HAILU et al. 2005) associado ao restabelecimento na produção de citocinas como IL-12, IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em culturas de PBMC estimuladas com LSA (HOLADAY et al. 1993a; CILLARI et al. 1995; BACELLAR et al. 2000). KEMP et al. (1999), demonstraram que em PBMC de indivíduos curados submetidas a 6 dias de cultura na presença de antígenos de *Leishmania donovani*, e reestimulados com PMA, as principais células produtoras de IFN- $\gamma$  ou IL-4 eram os LT CD4<sup>+</sup>. Além disso, eles observaram a presença de LT co-expressando IFN- $\gamma$  e IL-10, embora, cerca de 50% dos LT CD4<sup>+</sup> tenham sido exclusivamente células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, sugerindo o predomínio de resposta imune tipo 1 com a cura da LV clássica. Acredita-se que 70% dos linfócitos T produtores de citocinas apresentem fenótipo CD4<sup>+</sup> (HOLADAY et al. 1993a). O estímulo antígeno-específico não inibiu as funções celulares sugerindo que, após a cura, o indivíduo desenvolve um perfil de resposta imune protetor à re-infecção.

A resposta imune humoral e o papel dos linfócitos B na LV humana têm sido pouco estudados. É sabido que a LV clássica é caracterizada pela ativação policlonal de linfócitos B, seguida de produção exacerbada de imunoglobulinas, levando ao quadro de hipergamaglobulinemia e indução de formação de imunocomplexos (GALVÃO-CASTRO et al. 1984). Acredita-se que esta ativação policlonal envolva principalmente LB produtores de auto-anticorpos (LOUZIR et al. 1994) e que a elevada produção de anticorpos, não tenha papel preponderante no curso da infecção, uma vez que anticorpos específicos não conferem proteção à infecção. Observa-se a diminuição de LB ativados (LB CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) e da subpopulação de LB 1 (LB CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) no sangue periférico, sugerindo que essas células estejam sendo seqüestradas em órgãos linfóides secundários (LOUZIR et al. 1994; CENINI et al. 1993). Existem evidências de que células B humanas, de camundongos e linhagens celulares de macrófagos incubadas *in vitro* com a forma promastigota de *L. (L) chagasi*, apresentam uma diminuição seletiva na expressão de CD23, enquanto outros marcadores de superfície de células B, como MHC classe II, CD2 e IgM, permanecem inalterados. A diminuição de CD23 parece ser dependente do número de parasitos e requerer contato entre promastigotas e células B. Assim, a *L. (L) chagasi* promoveria modulação negativa e seletiva da expressão de CD23 em células B e em macrófagos (NOBEN NN et al. 1994). Por outro lado, CENINI et al. (1993) observaram aumento no número de linfócitos B

---

CD23<sup>+</sup> imediatamente após tratamento da LV e este aumento foi mantido a cerca de cinco meses após cura.

Apesar do grande número de estudos relacionados à resposta imune adaptativa na LV, pouco se conhece a respeito da participação das células da resposta imune inata, especialmente dos PMN, no direcionamento da resposta imune adaptativa e do curso da infecção. Estudos sobre o papel dos PMN na LV humana limitam-se à avaliação das funções efetoras dessas células na destruição dos parasitos após fagocitose, via ativação de mecanismos peroxidase-dependentes (LAZZARIN et al. 1985; PEARSON et al. 1981 e 1987). Embora importante no controle da disseminação inicial do parasito, parece que durante a LV clássica, a função fagocítica dessas células está diminuída devido à presença de altos níveis de imunocomplexos circulantes (CHANG 1981). Além disso, estudos indicam que o parasito modula a expressão de moléculas envolvidas direta ou indiretamente na apresentação de antígenos por PMN. REINER et al. (1987), descrevem que durante a infecção ativa por *L. (L.) donovani* ocorre diminuição na expressão de moléculas de MHC de classe I e II por neutrófilos. Outra importante molécula envolvida na infecção por *Leishmania* é o CD28. Estudos desenvolvidos por VENUPRASAD et al. (2002) em neutrófilos humanos do sangue periférico, demonstram que a interação com macrófagos infectados via CD28-CD80/CD86 resulta em indução e secreção de IFN- $\gamma$  que favoreceria o controle do crescimento de *L. major* nos macrófagos. Assim, a expressão de CD28 em neutrófilos está associada à função anti-*Leishmania*, ou seja, os neutrófilos apresentariam papel importante no direcionamento inicial das funções de macrófagos infectados.

Considerando o parasitismo intracelular obrigatório da *Leishmania*, é sabido que esse parasito infecta, sobrevive e multiplica nos macrófagos. Ele apresenta características associadas ao escape e sobrevivência na célula do hospedeiro. Tem sido descrito que as alterações funcionais estão associadas à diminuição na expressão de CD54 e HLA-DR (ALMEIDA et al. 2003) e aumento na expressão de CD86 (ALMEIDA et al. 2003) por macrófagos infectados por *L. (L.) chagasi*. É sabido que a infecção leva à diminuição na secreção de IL-12. Também a produção de TNF- $\alpha$  é alterada pela infecção (HO et al. 1992). Citocinas, em especial a IL-10, exercem papel inibidor da produção de IL-12 por macrófagos bem como da ativação de funções leishmanicidas dessas células, induzidas por IFN- $\gamma$ .

Ao se analisar as células NK, têm-se observado alterações no número e função dessas células. Observa-se diminuição do elo entre células NK e células

infectadas, e conseqüentemente, diminuição na capacidade de destruição, via atividade lítica, das células infectadas (CENINI et al. 1993; HARMS et al. 1991; MANNA et al. 1993). MANNA et al. (1993) observaram que a perda de atividade dessas células parece estar relacionada à ausência de IL-2. Além disso, NYLEN et al. (2003), demonstraram que após ativação antígeno-específica, células NK de indivíduos portadores de LV clássica, não produzem IFN- $\gamma$ , contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta imune ineficaz e para o favorecimento do crescimento do parasito.

Nesse contexto, observa-se ainda a necessidade de maiores investigações da resposta imune na LV, para a identificação de variáveis-chave no processo de categorização dos indivíduos avaliados, considerando que além dos aspectos inerentes ao parasito infectante, variáveis outras, como os aspectos clínicos dos indivíduos, podem ter impacto diferencial no perfil de resposta imune observado. A fim de contribuir para o entendimento dos mecanismos imunológicos associados à LV humana, com ênfase em células envolvidas na resposta imune inata e adaptativa, propusemos para esse estudo: uma investigação detalhada de características imunofenotípicas de leucócitos do sangue periférico de indivíduos portadores de LV e a avaliação do impacto da terapêutica etiológica, nos parâmetros fenotípicos celulares, através da análise de leucócitos do sangue periférico de indivíduos curados.

Estudo de alterações fenotípicas em células da imunidade inata e adaptativa na  
infecção por *Leishmania (L.) chagasi*

---

2- OBJETIVOS

## 2.1 - Objetivo Geral

Estudar as alterações fenotípicas em células da imunidade inata e adaptativa associadas à infecção por *Leishmania (L.) chagasi*.

## 2.2 - Objetivos Específicos

- 1- Caracterizar aspectos fenotípicos de leucócitos circulantes envolvidos na imunidade inata de indivíduos assintomáticos e portadores de LV clássica: ênfase em eosinófilos, neutrófilos, monócitos e células NK;
- 2- Analisar aspectos fenotípicos de linfócitos circulantes envolvidos na imunidade adaptativa de indivíduos assintomáticos e portadores de LV clássica: ênfase nas subpopulações de linfócitos T e B;
- 3- Avaliar o balanço entre os principais aspectos da imunidade inata e adaptativa de indivíduos assintomáticos e portadores de LV clássica;
- 4- Avaliar o impacto do tratamento etiológico eficaz em aspectos fenotípicos de células granulocíticas e mononucleares da imunidade inata em portadores de LV clássica;
- 5- Analisar o impacto do tratamento etiológico eficaz em aspectos fenotípicos da imunidade adaptativa de portadores de LV clássica;
- 6- Avaliar o balanço entre os principais aspectos da imunidade inata e adaptativa associados ao tratamento etiológico da LV clássica.



### 3- POPULAÇÃO E METODOLOGIA

### 3.1- Caracterização da população estudada

Neste estudo, foram utilizadas amostras de sangue periférico coletado em EDTA, de indivíduos não infectados, portadores de LV assintomática e curados após tratamento etiológico para a LV, residentes em Porteirinha – MG, uma área endêmica para LV e indivíduos portadores da LV clássica, residentes em Montes Claros – MG e na região metropolitana de Belo Horizonte – MG.

O município de Porteirinha localiza-se na região norte do Estado de Minas Gerais, zona do Alto Médio São Francisco, a 640 km de Belo Horizonte. Deste município, foram obtidas amostras de sangue de 67 indivíduos, avaliados e selecionados pela Dra. Luciana de Almeida Silva em colaboração com funcionários da FUNASA. A avaliação clínica consistiu de anamnese, exame físico, e realização de testes imunológicos (Intradermoreação de Montenegro – IDRM e Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI).

O município de Montes Claros, também se localiza no norte de Minas Gerais. Deste foi incluído um grupo de 9 indivíduos portadores da LV clássica, atendidos e avaliados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), pelo Dr. Sílvio Fernando Guimarães Carvalho em colaboração com a sua equipe. A avaliação clínica destes indivíduos consistiu de anamnese, exame físico, e teste imunológico para LV através da RIFI.

Este estudo incluiu também um grupo de 9 indivíduos portadores de LV clássica, provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte, atendidos no Centro de Referência para Tratamento de Leishmanioses do CPqRR, pela Dra. Ana Rabello, no Centro Geral de Pediatria – FHEMIG, pela Dra. Rosângela Figueiredo e no Hospital da Clínicas – UFMG, pela Dra. Teresa Ferrari. Em todas as instituições, a abordagem clínica e laboratorial consistiu de anamnese, exame físico, pesquisa direta de parasito (PDP) em punção de medula óssea e teste imunológico para LV através da RIFI.

Os indivíduos incluídos neste estudo foram classificados com base nas características clínicas e laboratoriais, em quatro grupos (Tabela 1):

- **LV clássica (ACT):** Indivíduos provenientes da cidade de Montes Claros e da região metropolitana de Belo Horizonte, clinicamente caracterizados como portadores de LV clássica por apresentarem a tríade característica da LV, isto é, febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Além disso, a positividade sorológica pela RIFI em todos os indivíduos foi considerada como critério de

inclusão. O diagnóstico confirmatório foi realizado na maioria dos indivíduos pela constatação da presença de formas amastigotas do parasito, através da análise de esfregaços de punção de medula óssea em microscopia ótica. Em alguns casos, a doença foi confirmada pelo acompanhamento da resposta terapêutica ao antimônio pentavalente. Em geral, quando se trata realmente de LV, o paciente apresenta melhora de estado geral rapidamente após o estabelecimento de terapêutica etiológica específica.

- **Assintomáticos (AS):** Indivíduos provenientes de Porteirinha, sem nenhum sinal ou sintoma clínico e sem história prévia de LV clássica. Todos apresentaram sorologia positiva para LV através da RIFI e em 54% dos casos foi constatada a positividade na IDRM.

- **Curados (CUR):** Indivíduos provenientes de Porteirinha que, em média há quatro anos atrás, apresentaram diagnóstico clínico, sorológico e parasitológico para LV e foram considerados curados após quimioterapia específica. Todos estes indivíduos apresentaram conversão da IDRM após quimioterapia, embora 56% deles, permanecessem com sorologia residual para a LV através da RIFI.

Além desses grupos, foi incluído um grupo controle de indivíduos residentes na área endêmica de Porteirinha e caracterizados como:

- **Não Infectados (NI):** Indivíduos sadios, sem nenhum sinal ou sintoma clínico e que não apresentaram relatos de infecção prévia por *Leishmania*. Todos apresentaram sorologia negativa para LV pela RIFI e resultados negativos na IDRM.

Tabela 1- Características da população estudada

Grupo	Mediana de Idades (variação)	Testes Imunológicos			Número de Indivíduos		
		RIFI	IDRM	PDP	Homens	Mulheres	Total
Não Infectado (NI)	11 (6 – 60)	-	-	NR	13	9	22
LV Clássica (ACT – Active Infection)	8,5 (1 – 67)	+	NR	+ / NR	12	6	18
Assintomático (AS)	33 (7 – 74)	+	+ / -	NR	10	12	22
Curado (CUR)	23 (3 – 49)	- / +	+	NR	10	13	23

(-) Não reagente; (+) Reagente; (NR) Não Realizado.

Cabe ressaltar, que embora diferentes aspectos demográficos possam apresentar-se como variáveis de confusão em estudos de populações humanas, no caso específico da LV, contemplar tais interferências representa um desafio rotineiro. Considerando a natureza aguda e o elevado grau de morbidade da infecção, a necessidade de intervenção terapêutica imediata, inviabilizou a inclusão de inúmeros indivíduos em nosso estudo. Dessa forma, tornou-se necessária a busca ativa de casos de LV numa ampla faixa de distribuição geográfica a fim de alcançar um número mínimo de indivíduos para avaliações imunológicas aceitáveis pela comunidade científica.

Este estudo cumpriu com as disposições da resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Protocolo 0070/99 – Anexo). Os indivíduos foram esclarecidos quanto ao estudo e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes Voluntários (Anexo).

### 3.2- Avaliação hematológica

A avaliação hematológica consistiu na realização do hemograma para contagem global e diferencial de leucócitos, incluindo neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. Essas avaliações foram realizadas no Laboratório de Doença de Chagas do CPqRR, Belo Horizonte. Para realização do procedimento, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de 5 mL contendo anticoagulante

EDTA (BD Vacutainer) e os parâmetros hematológicos avaliados em contador hematológico eletrônico de células (Coulter MD18, E.U.A.).

### **3.3- Avaliação imunofenotípica dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo**

Os ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram realizados segundo o protocolo proposto pelo fabricante Becton Dickinson, modificado conforme descrito a seguir:

Alíquotas de 100  $\mu$ L de sangue periférico, coletados em EDTA foram transferidas para tubos de poliestireno 12 x 75 cm (Falcon) contendo 5  $\mu$ L do anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse, conjugado com fluorocromos distintos (Tabela 2). As combinações de anticorpos monoclonais foram estabelecidas em função dos fenótipos de interesse e incluíram: IgG1-FITC/IgG1-PE; CD4-FITC/CD3-PE; CD8-FITC/CD3-PE; CD16-FITC/CD3-PE; CD19-FITC/CD3-PE; CD4-FITC/HLA-DR-PE; CD8-FITC/HLA-DR-PE; CD4-FITC/CD28-PE; CD4-FITC/CD25-PE; CD5-FITC/CD19-PE; CD19-FITC/CD23-PE; CD14-FITC/CD86-PE; CD19-FITC/CD86-PE. Após homogeneização em vórtex, a mistura reacional foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2mL de solução de lise comercial (FACS™ Lysing Solution – Becton Dickinson). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 400 x g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi descartado, as amostras lavadas com 2 mL de PBS (0,0015M pH 7,4), sendo novamente submetidas às mesmas condições de centrifugação. Por fim, as amostras foram fixadas com 200  $\mu$ L de solução fixadora – MFF (10g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). A análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos das células presentes em cada tubo foi determinada com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson), utilizando o programa CELLQuest™ para aquisição e análise dos dados. Para cada imunofenotipagem, foram coletadas informações relativas aos aspectos morfométricos de tamanho e granulosidade, bem como aspectos imunofenotípicos de 20.000 eventos. As informações foram armazenadas em arquivos com extensão FCS, empregando a modalidade de arquivamento de resolução de 1024 canais e na modalidade “List

Mode” para posterior geração dos dados, empregando diferentes estratégias de análise.

**Tabela 2- Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações e subpopulações celulares e moléculas de superfície**

<b>Anticorpos</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Células Alvo</b>
Anti-IgG1	FITC, PE	Controle Isotópico
Anti-CD3	PE	Linfócitos T
Anti-CD4	FITC	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD5	FITC	Linfócitos B1
Anti-CD8	FITC	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD14	FITC	Monócitos
Anti-CD16	FITC	Células NK, Neutrófilos, Monócitos
Anti-CD19	FITC, PE	Linfócitos B
Anti-CD23	PE	Eosinófilos, Neutrófilos, Monócitos, Linfócitos B
Anti-CD25	PE	Linfócitos T
Anti-CD28	PE	Eosinófilos, Neutrófilos, Monócitos, Linfócitos T
Anti-CD86	PE	Eosinófilos, Neutrófilos, Monócitos, Linfócitos B
Anti-HLA-DR	PE	Eosinófilos, Neutrófilos, Monócitos, Linfócitos T e B

### 3.4- Estratégias de análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo

Os dados obtidos através da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico dos indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR) foram analisados utilizando-se de estratégias específicas dependendo do fenótipo celular de interesse.

Assim, foram abordados os seguintes tópicos de investigação:

#### Aspectos da Imunidade Inata:

- Aspectos fenotípicos de eosinófilos circulantes:

- Freqüência da expressão do marcador HLA-DR
- Freqüência da expressão do marcador CD23

- Freqüência da expressão do marcador CD28
  - Freqüência da expressão do marcador CD86
- Aspectos fenotípicos de neutrófilos circulantes:
- Freqüência da expressão do marcador HLA-DR
  - Freqüência da expressão do marcador CD23
  - Freqüência da expressão do marcador CD28
  - Freqüência da expressão do marcador CD86
- Aspectos fenotípicos de monócitos circulantes:
- Densidade de expressão de HLA-DR
  - Freqüência de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>)
  - Freqüência da expressão do marcador CD23
- Aspectos fenotípicos de células Natural Killer (NK) circulantes:
- Freqüência de células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>)
- Aspectos da Imunidade Adaptativa:**
- Aspectos fenotípicos de linfócitos T circulantes:
- Freqüência de subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>)
  - Freqüência de subpopulações de linfócitos T ativados (HLA-DR<sup>+</sup>)
  - Freqüência da expressão de CD28 (CD4<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>)
  - Freqüência de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>)
- Aspectos fenotípicos de linfócitos B circulantes:
- Freqüência de linfócitos B (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>)
  - Freqüência de subpopulações de linfócitos B (B2 - CD5<sup>-</sup> e B1 - CD5<sup>+</sup>)
  - Densidade de expressão de HLA-DR
  - Freqüência de linfócitos B ativados (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>)
  - Densidade de expressão de CD86

**Balanco da resposta imune na LV:**

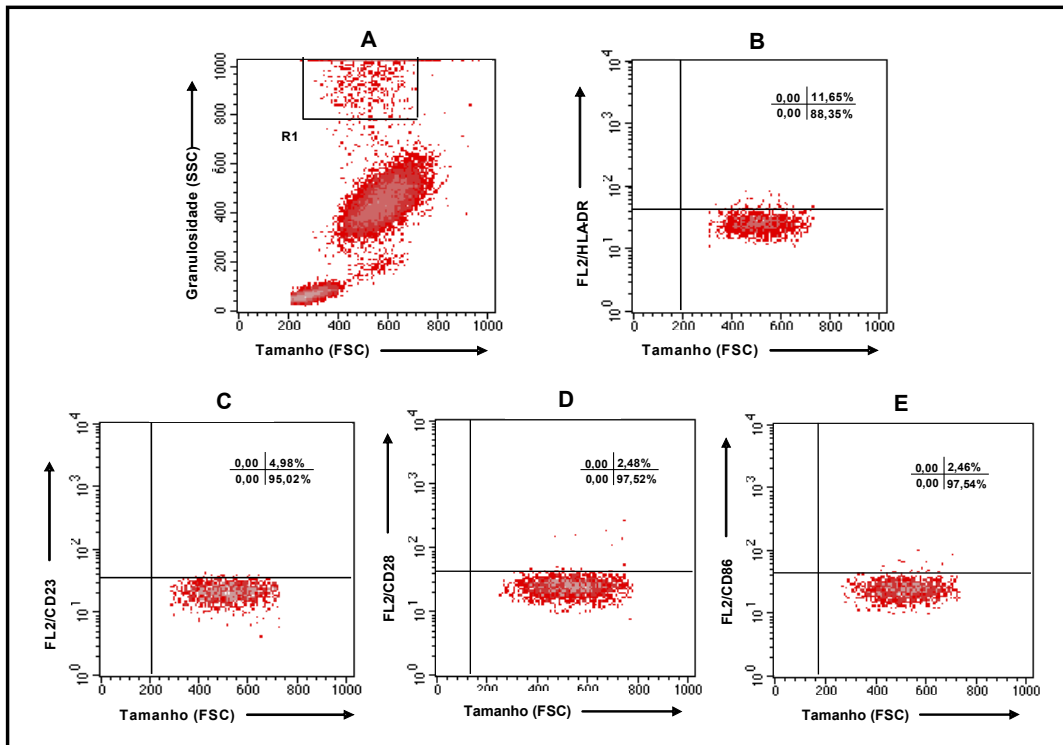
- Razão entre o percentual de monócitos pró-inflamatórios e linfócitos T CD8 ativados (CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>)
- Razão entre o percentual de monócitos pró-inflamatórios e linfócitos B ativados (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>)
- Razão entre o percentual de monócitos pró-inflamatórios e células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>)
- Razão entre o percentual de linfócitos T ativados (CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>)
- Razão entre o percentual de linfócitos T ativados e células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>)
- Razão entre o percentual de linfócitos T ativados e linfócitos B ativados (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>)

Empregando os recursos múltiplos de análise de dados disponíveis no programa CellQuest<sup>TM</sup>, foram adotadas diferentes estratégias para análise fenotípica de células envolvidas na imunidade inata e adaptativa, baseada em 11 modalidades disponíveis, denominadas aqui em função do fenótipo celular de interesse como descrito a seguir:

**3.4.1- Estratégia de análise de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup>**

As análises de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> foram feitas conforme descrito a seguir: a seleção da região de interesse (R1) foi baseada em aspectos morfométricos em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), para a identificação da população de eosinófilos como células FSC<sup>Intermediário</sup>SSC<sup>High</sup>. A pureza da população de eosinófilos foi garantida através da inclusão seletiva de células autofluorescentes selecionadas em gráficos de distribuição puntual de FL1 (CD19-FITC ou CD4-FITC) versus fluorescência não relacionada (FL3). Em seguida foram construídos gráficos de tamanho (FSC) versus FL2/HLA-DR, FL2/CD23, FL2/CD28 e FL2/CD86 para determinação do percentual de células HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> dentro da população de eosinófilos previamente selecionada em R1 (Figura 1).



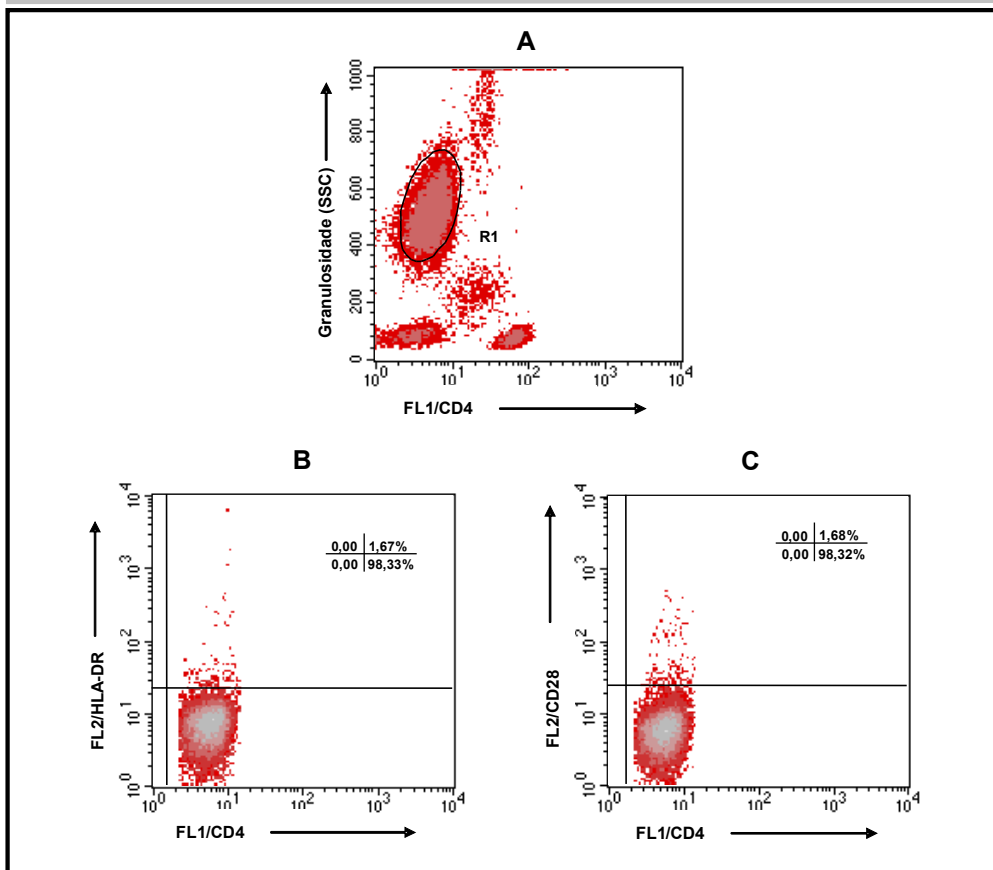


**Figura 1:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> no sangue periférico.

(A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com fenótipo FSC<sup>Intermediário</sup>SSC<sup>High</sup>. (B, C, D e E) Gráficos de distribuição puntual FSC versus FL2/HLA-DR (B) FL2/CD23 (C), FL2/CD28 (D) e FL2/CD86 (E), contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup>.

### 3.4.2- Estratégia de análise de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup>

As análises de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup> foram feitas conforme descrito a seguir: a seleção da região de interesse (R1) foi baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição puntual de FL1/CD4 versus granulosidade (SSC), para a identificação da população de neutrófilos como células CD4<sup>-</sup>SSC<sup>High</sup>, minimizando assim a contaminação da região selecionada por monócitos e eosinófilos. Em seguida foram construídos gráficos de FL1/CD4 versus FL2/ HLA-DR e FL2/CD28 para determinar o percentual de células HLA-DR<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup> dentro da população de neutrófilos previamente selecionada em R1 (Figura 2).

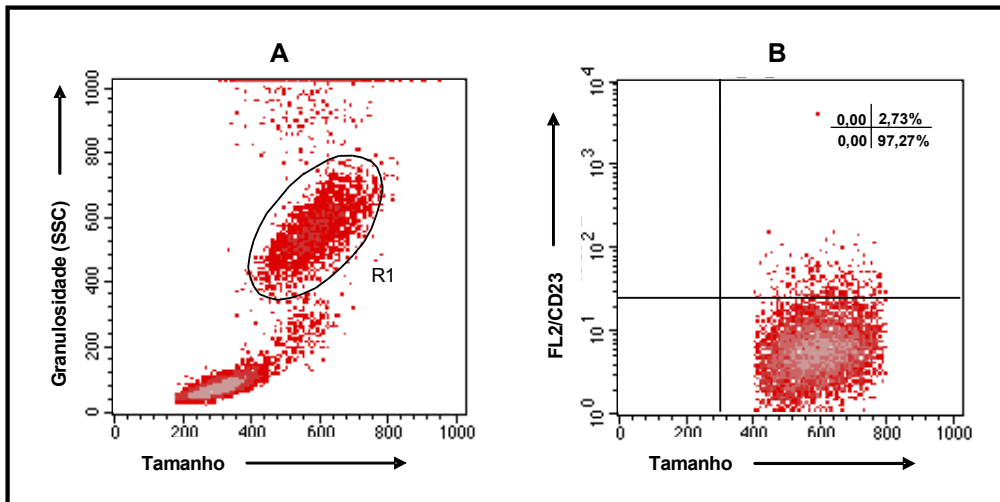


**Figura 2:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup> no sangue periférico.

(A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com fenótipo CD4<sup>-</sup>SSC<sup>High</sup>. (B e C) Gráficos de distribuição puntual FL1/CD4 versus FL2/HLA-DR (B) e FL1/CD4 versus FL2/CD28 (C), contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup>.

### 3.4.3- Estratégia de análise de neutrófilos CD23<sup>+</sup>

A análise de neutrófilos CD23<sup>+</sup> foi feita conforme descrito a seguir: a seleção da região de interesse (R1) foi baseada em aspectos morfológicos em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), para a identificação da população de neutrófilos definidos através do fenótipo FSC<sup>Intermediário</sup>SSC<sup>High</sup>. Em seguida, foram construídos gráficos de tamanho (FSC) versus FL2/CD23 para quantificar o percentual de células CD23<sup>+</sup> dentro da população de neutrófilos previamente selecionada em R1 (Figura 3).

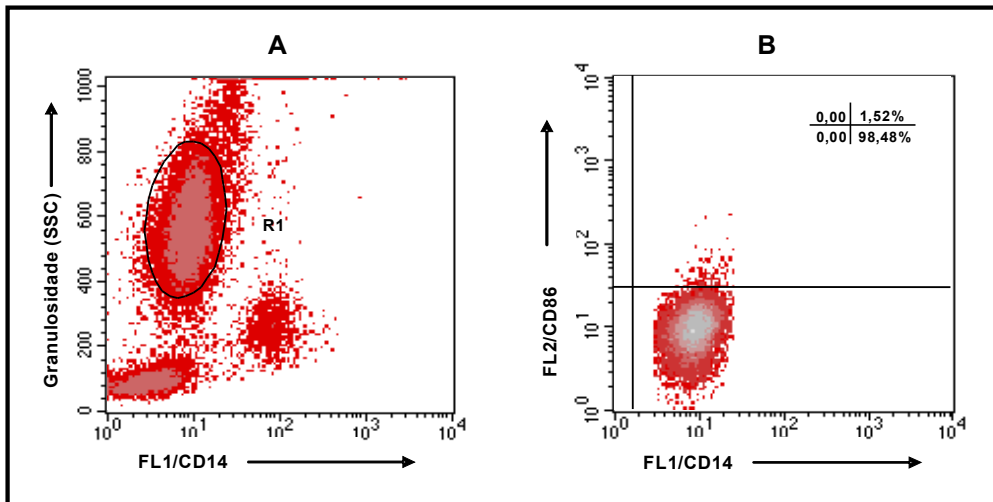


**Figura 3:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de neutrófilos CD23<sup>+</sup> no sangue periférico.

(A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com o fenótipo FSC<sup>Intermediário</sup>SSC<sup>High</sup>. (B) Gráfico de distribuição puntual FSC versus FL2/CD23, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de neutrófilos CD23<sup>+</sup>.

#### 3.4.4- Estratégia de análise de neutrófilos CD86<sup>+</sup>

A análise de neutrófilos CD86<sup>+</sup> foi realizada conforme descrito a seguir: a seleção da região de interesse (R1) foi baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição puntual de FL1/CD14 versus granulosidade (SSC), para a identificação da população de neutrófilos como células CD14<sup>Low+</sup>SSC<sup>High</sup>, minimizando assim a contaminação da região selecionada por monócitos. Em seguida foram construídos gráficos de FL1/CD14 versus FL2/CD86 para determinar o percentual de células CD86<sup>+</sup> dentro da população de neutrófilos previamente selecionada em R1 (Figura 4).

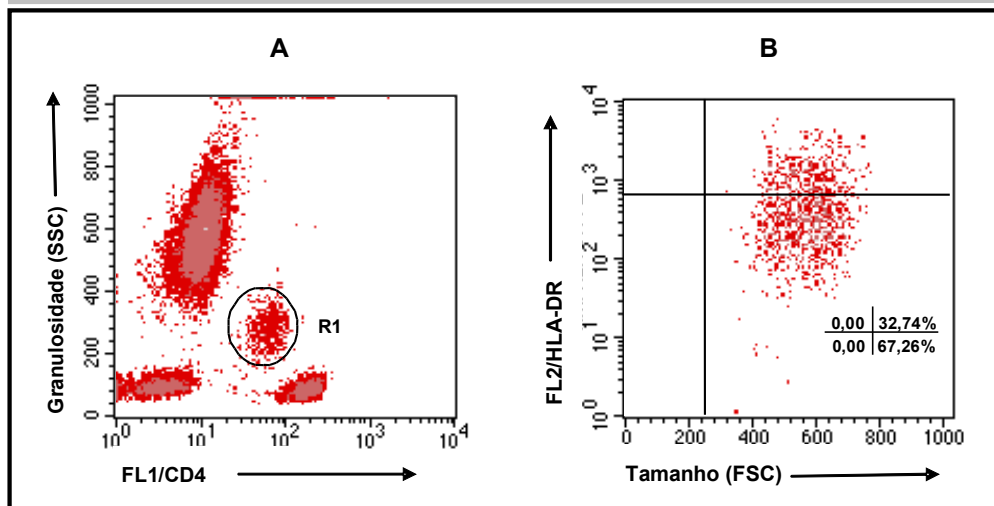


**Figura 4:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de neutrófilos CD86<sup>+</sup> no sangue periférico.

(A) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD4 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com o fenótipo CD14<sup>Low+</sup>SSC<sup>High</sup>. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD4 versus FL2/CD86, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de neutrófilos CD86<sup>+</sup>.

### 3.4.5- Estratégia de análise de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>)

A análise de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>) foi feita segundo protocolo proposto por BELGE et al. (2002), modificado conforme descrito a seguir: inicialmente foi delimitada a região de interesse (R1), baseando-se em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição puntual de FL1/CD4 versus granulosidade (SSC) para a identificação da população de monócitos como células CD4<sup>low+</sup>SSC<sup>Intermediário</sup>. Em seguida, foram construídos gráficos de tamanho (FSC) versus FL2/HLA-DR para quantificar o percentual de células HLA-DR<sup>++</sup> dentro da população de monócitos previamente selecionada em R1 (Figura 5). O limiar de expressão de HLA-DR<sup>++</sup> foi estabelecido em função do perfil de expressão de HLA-DR por linfócitos.

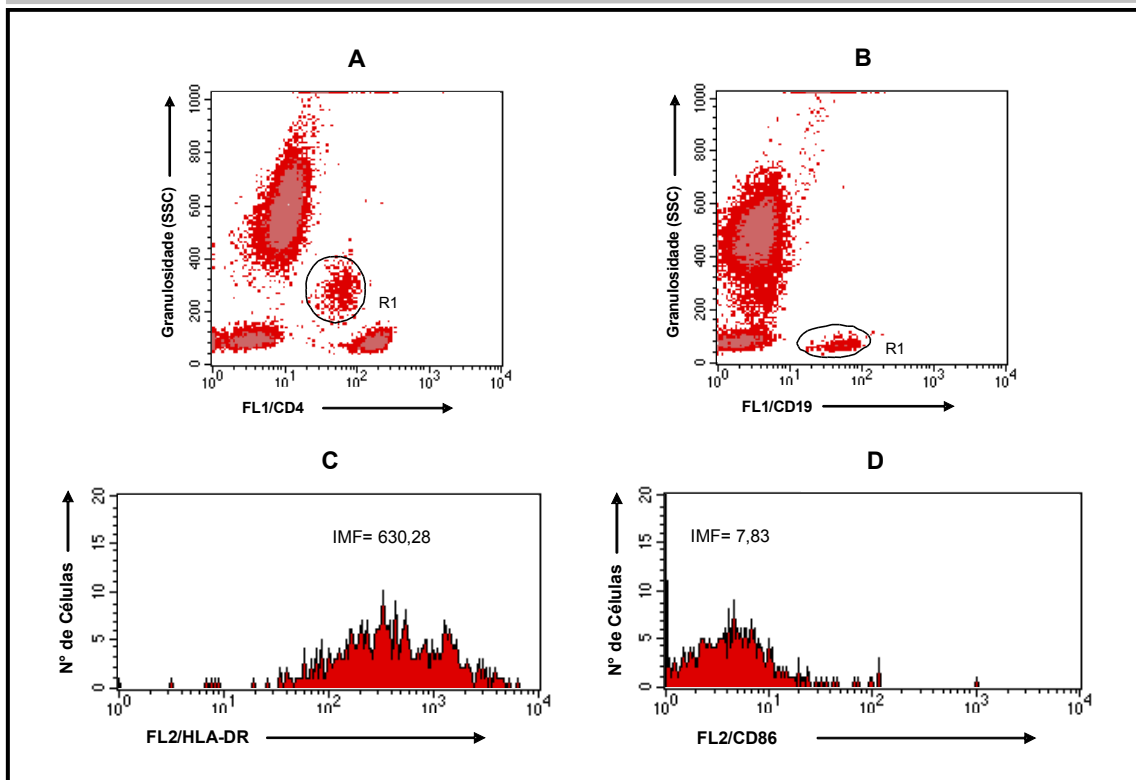


**Figura 5:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos pro-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>) no sangue periférico.

(A) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD4 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com o fenótipo CD4<sup>low+</sup>SSC<sup>Intermediário</sup> (B) Gráfico de distribuição puntual FSC versus FL2/HLA-DR, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de monócitos pro-inflamatórios.

### 3.4.6- Análise da densidade de expressão de HLA-DR em monócitos e expressão de CD86 em linfócitos B

A expressão da molécula HLA-DR e CD86 na população de monócitos e linfócitos B respectivamente, foi determinada através da análise semi-quantitativa por intensidade média de fluorescência (IMF) conforme descrito a seguir: a seleção da região R1, em gráficos de distribuição puntual de FL1 (CD4-FITC e CD19-FITC) versus granulosidade (SSC) foi baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos da população celular de interesse – monócitos apresentado-se como CD4<sup>Low+</sup>SSC<sup>Intermediário</sup> e linfócitos B com fenótipo CD19<sup>+</sup>SSC<sup>Low</sup>. Em seguida, foram construídos histogramas unidimensionais de intensidade de fluorescência FL2/HLA-DR ou FL2/CD86 a fim de determinar a intensidade média de fluorescência da expressão do HLA-DR ou CD86 pela população de monócitos ou linfócitos B previamente selecionada em R1 (Figura 6).

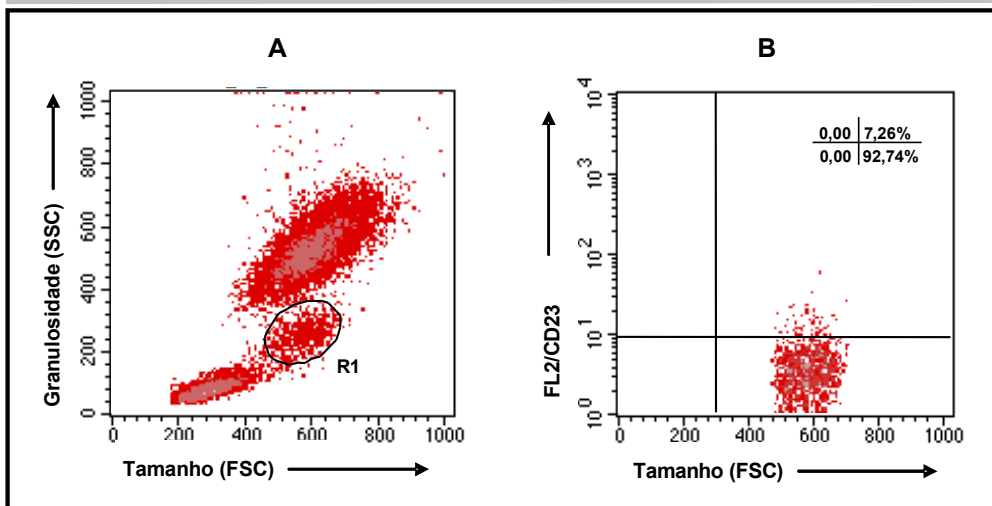


**Figura 6:** Seqüência de procedimentos utilizados para avaliar a expressão das moléculas HLA-DR e CD86 em monócitos e linfócitos B no sangue periférico, respectivamente.

(A e B) Gráficos de distribuição puntual FL1 versus SSC utilizados para a seleção da população celular de monócitos (A) e linfócitos B (B) em R1, considerando-se os fenótipos CD4<sup>Low</sup>SSC<sup>Intermediário</sup> e CD19<sup>+</sup>SSC<sup>Low</sup>. (C e D) Histogramas unidimensionais de fluorescência FL2/HLA-DR (C) e FL2/CD86 (D), contendo as células selecionadas nas regiões R1, utilizados para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de HLA-DR por monócitos e CD86 por linfócitos B.

### 3.4.7 - Estratégia de análise de monócitos CD23<sup>+</sup>

A análise de monócitos CD23<sup>+</sup> foi feita conforme descrito a seguir: a seleção da região de interesse (R1) foi baseada em aspectos morfológicos em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), para a identificação da população de monócitos, com fenótipo FSC<sup>Intermediário</sup>SSC<sup>Intermediário</sup>. Em seguida foram construídos gráficos de tamanho (FSC) versus FL2/CD23 para quantificar o percentual de células CD23<sup>+</sup> dentro da população de monócitos previamente selecionada em R1 (Figura 7).

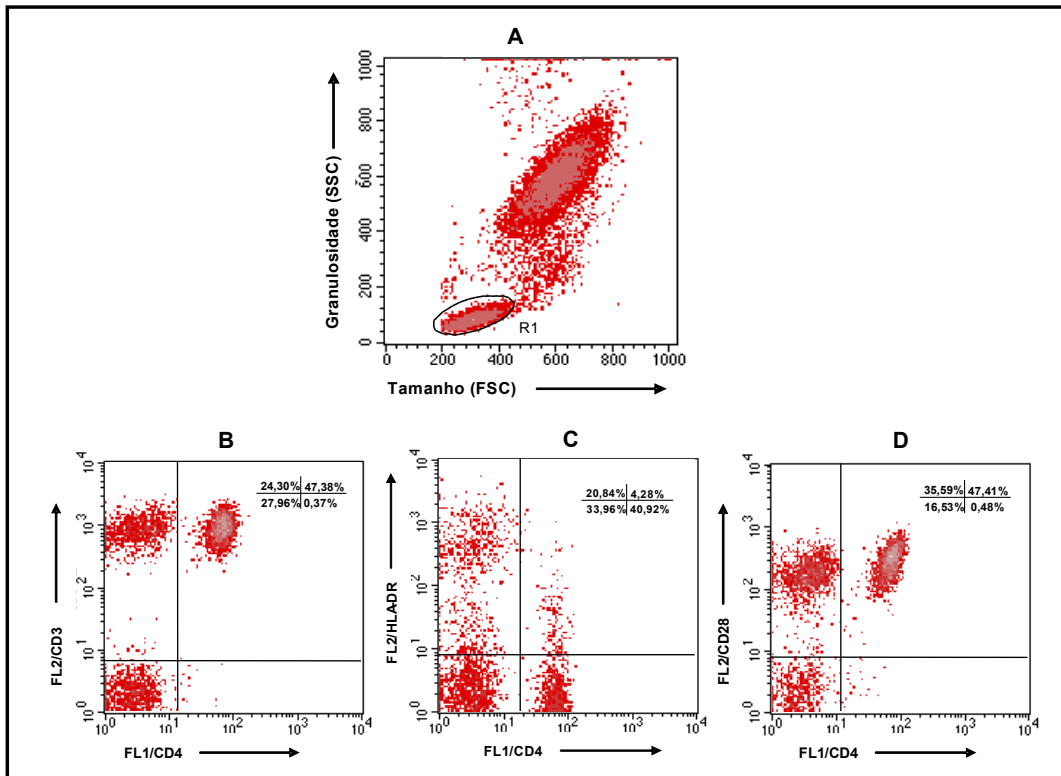


**Figura 7:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos CD23<sup>+</sup> no sangue periférico.

(A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, considerando-se os fenótipos  $FSC^{intermediário}SSC^{intermediário}$ . (B) Gráfico de distribuição puntual FSC versus FL2/CD23, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de monócitos CD23<sup>+</sup>.

### 3.4.8- Estratégia de análise de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup>), células NK e das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (HLA-DR<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup>) e CD8<sup>+</sup> (HLA-DR<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD5<sup>-</sup>, CD5<sup>+</sup> e CD23<sup>+</sup>)

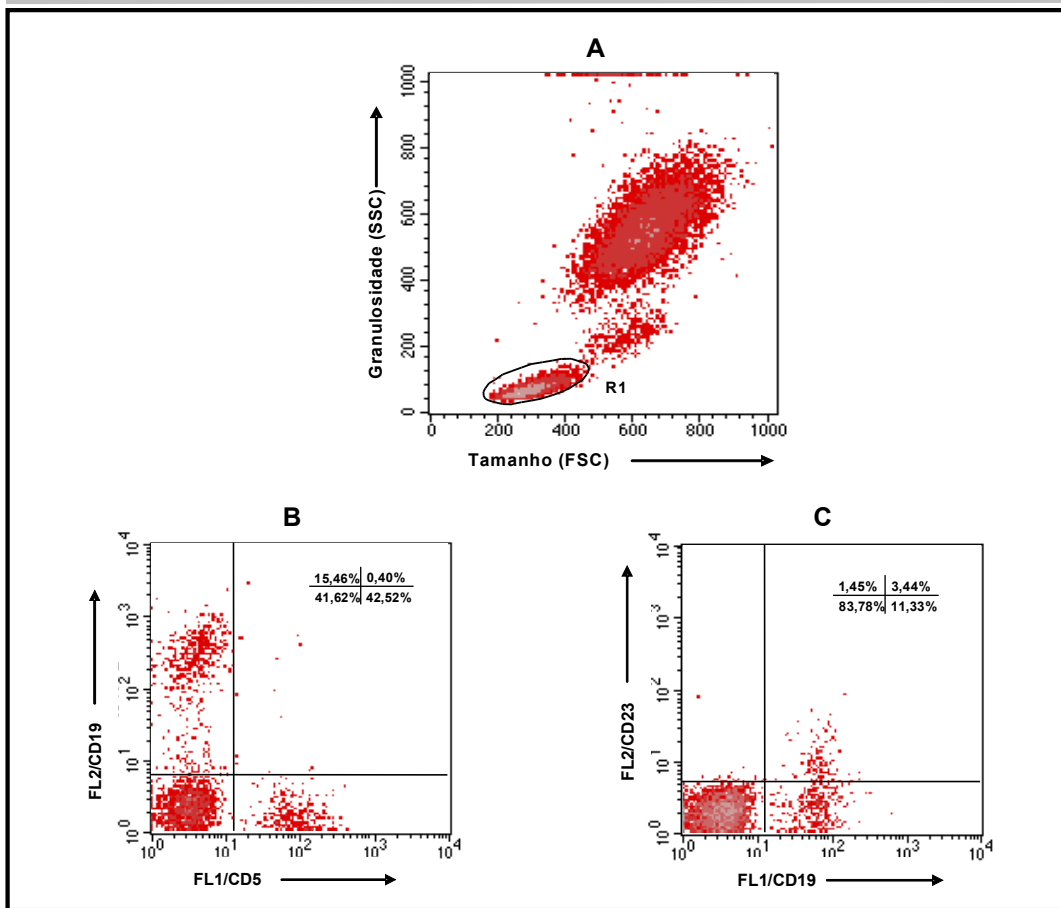
As análises das freqüências de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (HLA-DR<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup>) e TCD8<sup>+</sup> (HLA-DR<sup>+</sup>), linfócitos B, CD19<sup>+</sup> (CD5<sup>-</sup>, CD5<sup>+</sup> e CD23<sup>+</sup>) e células NK foram realizadas utilizando-se da estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo  $FSC^{Low}SSC^{Low}$ , o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição puntual de fluorescência, como exemplificado nas figuras 8, 9 e 10.



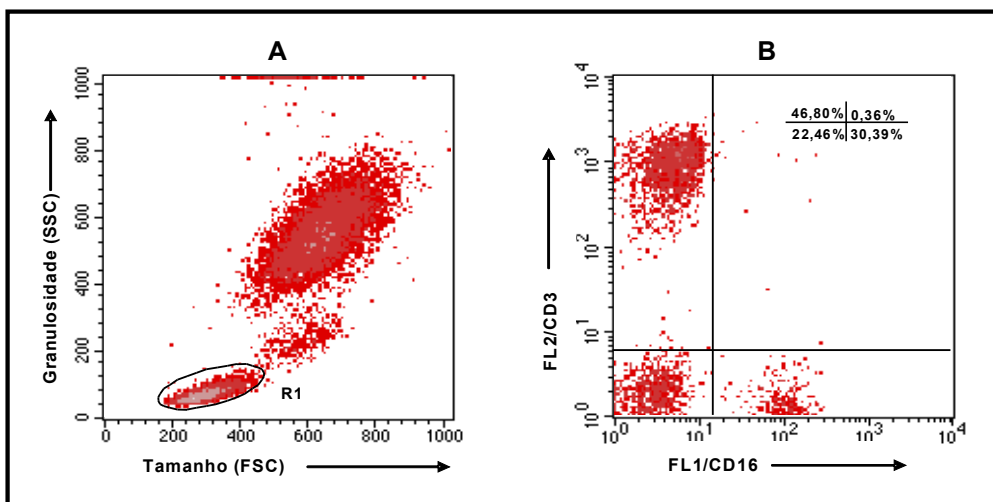
**Figura 8:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, no sangue periférico.

(A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup>. (B, C e D) Gráficos de distribuição puntual FL1/CD4 versus FL2/CD3 (B), FL1/CD4 versus FL2/HLA-DR (C) e FL1/CD4 versus FL2/CD28 (D), contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos T.





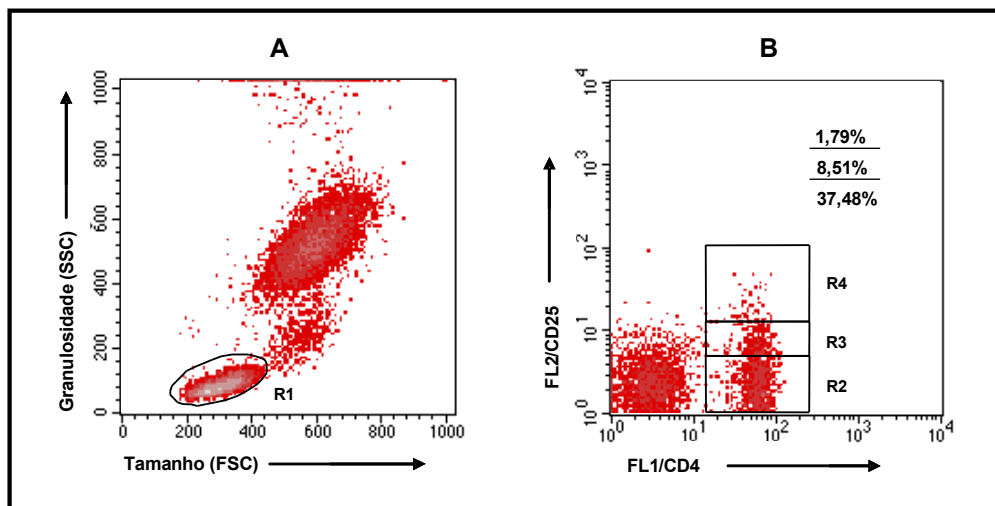
**Figura 9:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de subpopulações de linfócitos B CD5<sup>+</sup> ou CD5<sup>-</sup> e CD23<sup>+</sup> no sangue periférico. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup>. (B e C) Gráficos de distribuição puntual FL1/CD5 versus FL2/CD19 (B) e FL1/CD19 versus FL2/CD23 (C), contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos B.



**Figura 10:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de células NK no sangue periférico. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup>. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD16 versus FL2/CD3, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de células NK.

### 3.4.9- Estratégia de análise de células T reguladoras

A análise de células T reguladoras foi realizada segundo proposto por BAECHER-ALLAN et. al (2001). A figura 11 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise de células T reguladoras com fenótipo  $CD4^+CD25^{HIGH}$ . A seleção da região R1, em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC) foi baseada em aspectos morfométricos da população celular de interesse – linfócitos apresentando-se como  $FSC^{LOW}SSC^{LOW}$  (Figura 11A). Em seguida, foram construídos gráficos de FL1/CD4 versus FL2/CD25 permitindo a identificação de 3 subpopulações:  $CD4^+CD25^-$  (R2),  $CD4^+CD25^{LOW}$  (R3) e  $CD4^+CD25^{HIGH}$  (R4). A fração celular confinada em R4 apresenta o valor percentual de células T reguladoras na população de linfócitos totais (Figura 11B).



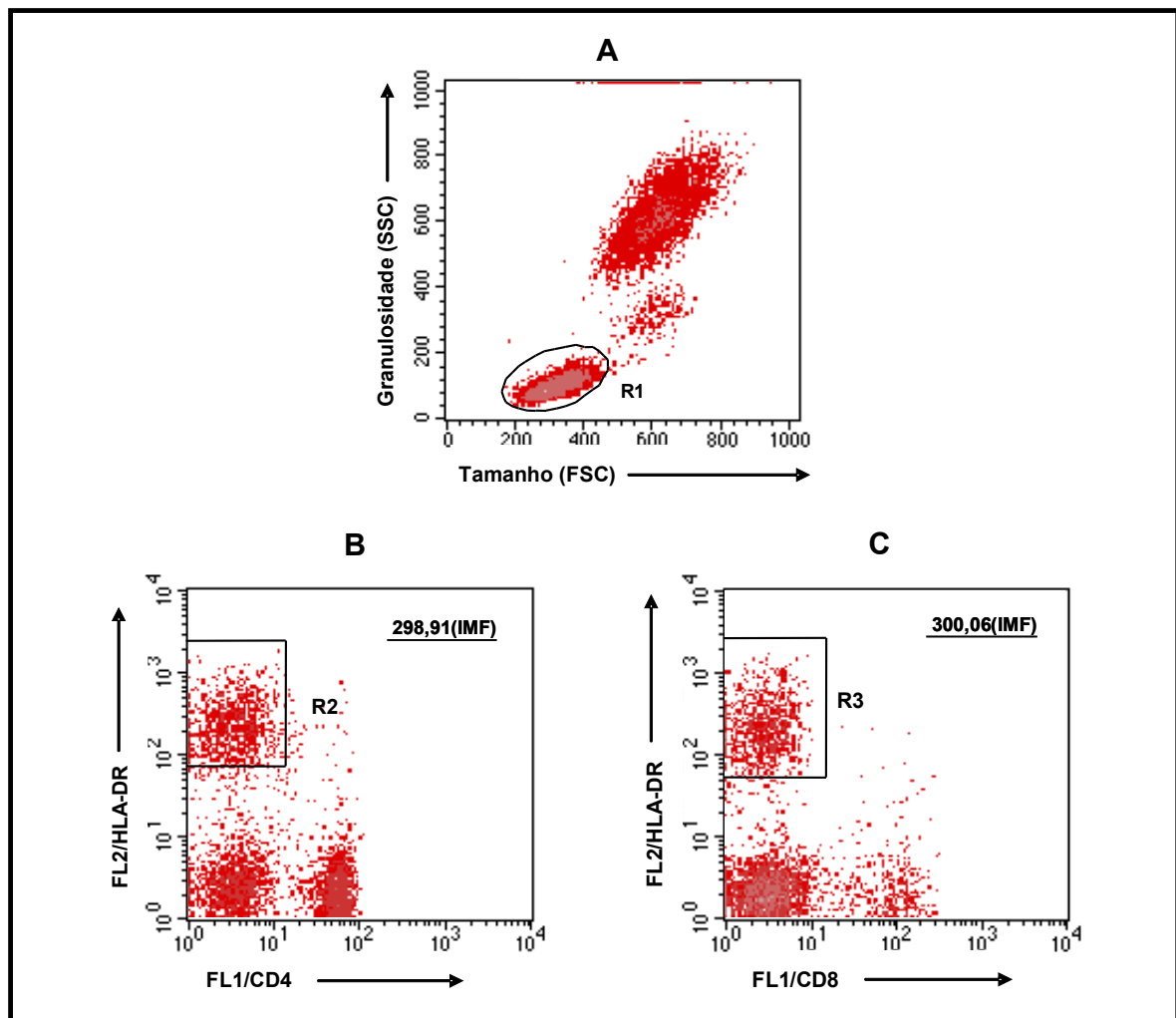
**Figura 11:** Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras ( $CD4^+CD25^{HIGH}$ ) por citometria de fluxo.

(A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado pra a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos - R1, com fenótipo  $FSC^{LOW}SSC^{LOW}$ . (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD4 versus FL2/CD25 utilizado para quantificar o percentual de células T reguladoras ( $CD4^+CD25^{HIGH}$ ), confinadas em R4.

### 3.4.10- Análise da densidade de expressão de HLA-DR em linfócitos B

A expressão da molécula HLA-DR na população de linfócitos B foi determinada através da análise semi-quantitativa por intensidade média de fluorescência (IMF), seguida por cálculos adicionais como descrito a seguir: Inicialmente, a seleção da região R1 em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC) foi baseada em aspectos morfométricos da população celular de interesse – linfócitos apresentando-se como  $FSC^{LOW}SSC^{LOW}$ . Em

seguida foram construídos gráficos de distribuição puntual de fluorescência FL1/CD4 ou FL1/CD8 versus FL2/HLA-DR, contendo as células selecionadas em R1. Posteriormente, foram selecionadas as células CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>High</sup> (R2) ou CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>High</sup> (R3). Numa etapa final, a intensidade média de fluorescência da expressão de HLA-DR pela população de linfócitos B foi determinada como a média da intensidade de fluorescência de HLA-DR expressa por células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.



**Figura 12:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar a expressão da molécula HLA-DR na população de linfócitos B no sangue periférico.

(A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos - R1, com fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup>. (B e C) Gráficos de distribuição puntual FL1/CD4 versus FL2/HLA-DR (B) e FL1/CD8 versus FL2/HLA-DR (C) contendo células selecionadas na região R1, utilizados para quantificar a expressão de HLA-DR em linfócitos B como a média da intensidade de fluorescência de HLA-DR expressa por células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

### **3.5- Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 3.0.3 (San Diego CA). Todos os resultados desse estudo assumiram distribuição não paramétrica, ou seja, dados que apresentavam um comportamento não gaussiano, ou distribuição não-normal. Assim, primeiramente, o teste ANOVA Kruskal-Wallis foi aplicado, seguido pelo teste de comparações múltiplas Dunn's. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ . Todo o procedimento de análise estatística dos dados foi realizado sob a supervisão e orientação da Bioestatística Ana Carolina Lustosa Lima, consultora de estatística do CPqRR.

## 4- RESULTADOS

Nesse trabalho os resultados foram expressos sob três formas distintas: percentual de células e número absoluto de células expressando um determinado marcador fenotípico (células positivas/mm<sup>3</sup> de sangue) além da densidade de expressão de um determinado marcador fenotípico numa dada população celular (intensidade média de fluorescência – IMF).

As análises em percentual e valor absoluto foram empregadas para quantificar fenótipos celulares que apresentam distribuição bimodal, ou seja, populações positivas e populações negativas para o referido marcador fenotípico. Para a abordagem em valor absoluto, foi necessário considerarmos a frequência percentual da subpopulação celular expressando o marcador fenotípico de interesse para os cálculos adicionais. O produto desse valor pelo número absoluto da população celular de interesse foi calculado segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Células positivas/mm}^3 \text{ de sangue} = \frac{\% \text{ de células positivas} \times \text{valor absoluto da subpopulação celular}}{100}$$

O número absoluto da população celular de interesse foi determinado através da análise do perfil hematológico de leucócitos circulantes. Esta abordagem nos permitiu também investigar uma possível alteração inicial na própria composição dos leucócitos presentes no sangue periférico nas diferentes formas clínicas da LV.

Como demonstrado na Tabela 3, indivíduos com a forma clássica (ACT) da infecção por *L. (L.) chagasi*, apresentaram quadro de leucopenia, onde foi possível observar diminuição, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), do número absoluto de leucócitos totais e suas subpopulações, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos circulantes deste grupo quando comparado aos grupos não-infectados (NI), assintomáticos (AS) e curados (CUR).

Tabela 3- Perfil hematológico dos leucócitos do sangue periférico de indivíduos NI, AS, ACT e CUR\*

População Celular	Não-Infetados (NI)	Assintomáticos (AS)	LV Clássica (ACT)	Curados (CUR)
Leucócitos	7.000±1.388	6.400±1.470	<b>3.200±1.142</b> a,b,c	7.200±1.425
Neutrófilos	2.449±1.164	2.563±967	<b>1.326±702</b> a,b,c	2.784±1.093
Eosinófilos	271±231	135±137	<b>52±49</b> a,b,c	228±162
Monócitos	258±89	257±115	<b>80±88</b> a,b,c	400±207
Linfócitos	3.361±1.451	3.108±1.188	<b>1.782±920</b> a,b,c	3.808±1.074

\* Os resultados foram expressos como a mediana do número de células/mm<sup>3</sup> de sangue periférico ± desvio padrão. As letras **a**, **b** e **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e CUR respectivamente.

Numa outra abordagem, foi utilizada análise semi-quantitativa da expressão de marcadores fenotípicos que possuem distribuição unimodal, ou seja, embora toda a população celular de interesse expresse constitutivamente o referido marcador fenotípico, a densidade de expressão pode variar caracterizando o deslocamento da população celular ao longo do eixo da intensidade de fluorescência. Nesse caso, os resultados foram expressos como média da intensidade de fluorescência obtida em escala logarítmica variando de 1 a 10.000.

## I- Aspectos imunofenotípicos associados à infecção por *L. (L.) chagasi*

### 4.1- Caracterização de aspectos fenotípicos de células envolvidas na IMUNIDADE INATA de indivíduos assintomáticos e portadores de LV clássica: ênfase em eosinófilos, neutrófilos, monócitos e células NK

#### 4.1.1- Aspectos fenotípicos de eosinófilos circulantes

##### 4.1.1.1 - Frequência de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup>

A figura 13 mostra os resultados da frequência de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT).

A análise dos dados demonstrou que o grupo ACT apresenta frequência de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup> significativamente menor (figura 13A) do que os grupos NI e AS (NI=16,88/mm<sup>3</sup>; AS=17,75/mm<sup>3</sup>; ACT=4,23/mm<sup>3</sup>).

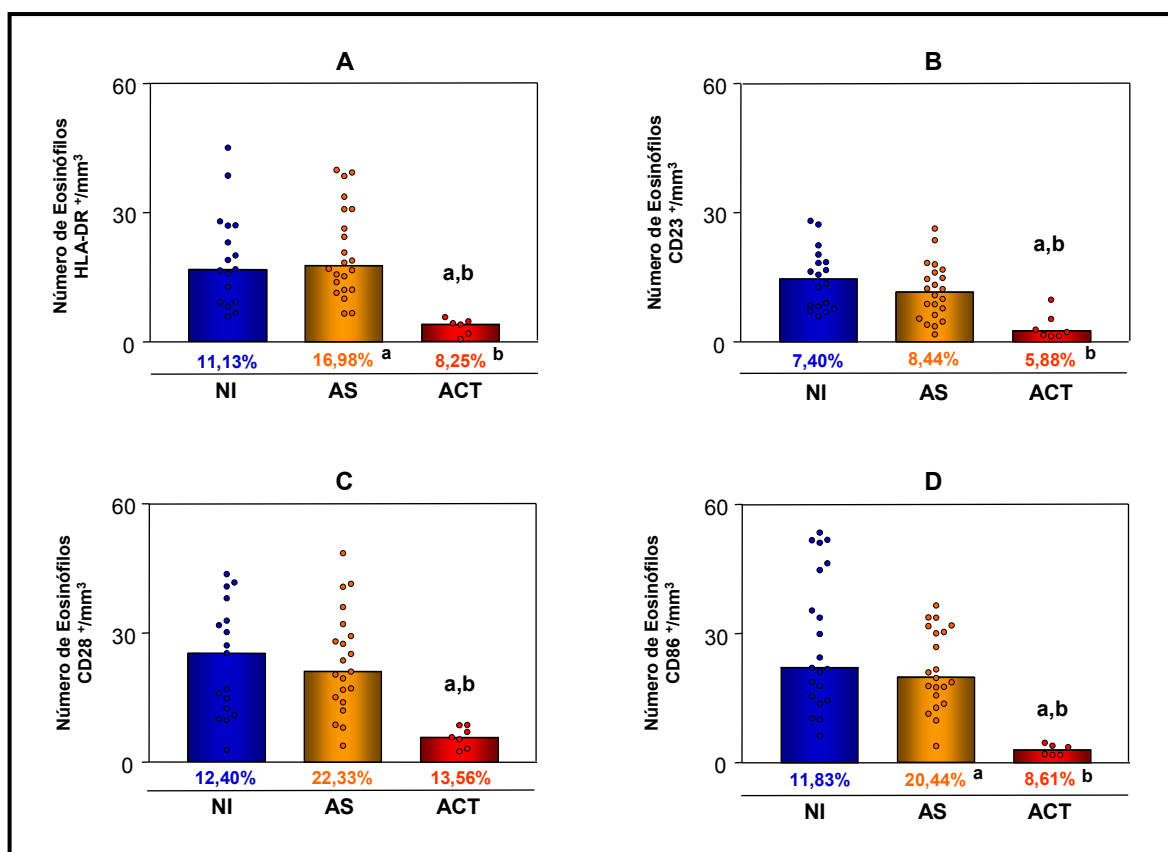
Como demonstrado na figura 13B, a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta menor frequência de eosinófilos CD23<sup>+</sup> quando comparado aos grupos NI e AS (NI=14,60/mm<sup>3</sup>; AS=11,64/mm<sup>3</sup>; ACT=2,37/mm<sup>3</sup>).

Observa-se também menor frequência de eosinófilos CD28<sup>+</sup> (figura 13C) no grupo ACT em relação aos grupos NI e AS (NI=25,35/mm<sup>3</sup>; AS=21,09/mm<sup>3</sup>; ACT=5,86/mm<sup>3</sup>).

Na figura 13D a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta menor frequência de eosinófilos CD86<sup>+</sup> em relação aos grupos NI e AS (NI=22,11/mm<sup>3</sup>; AS=19,76/mm<sup>3</sup>; ACT=2,87/mm<sup>3</sup>).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta um menor percentual de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> em relação ao grupo AS (Figura 13A, B e D, respectivamente). Observa-se também que o grupo AS apresenta maior percentual de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> quando comparado com o grupo NI (Figura 13A e D, respectivamente).





**Figura 13:** Número de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, CD23<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, CD28<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> e CD86<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

A população de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se os anticorpos monoclonais anti-HLA-DR anti-CD23<sup>+</sup>, anti-CD28<sup>+</sup> e anti-CD86<sup>+</sup> marcados com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> na população de eosinófilos. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

#### 4.1.2 - Aspectos fenotípicos de neutrófilos circulantes

##### 4.1.2.1- Frequência de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup>

A figura 14 mostra os resultados da frequência de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT).

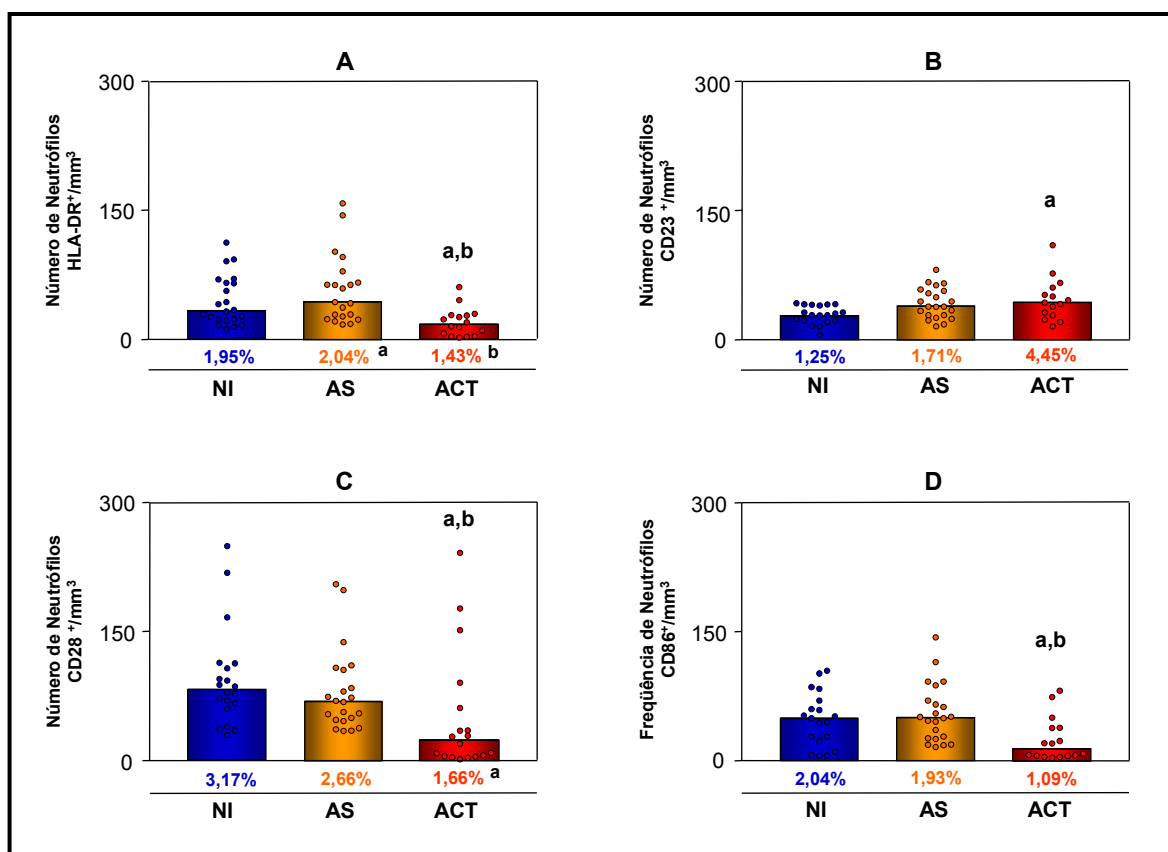
Na figura 14A a análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta menor frequência de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> quando comparado aos grupos NI e AS (NI=33,49/mm<sup>3</sup>; AS=43,71/mm<sup>3</sup>; ACT=17,76/mm<sup>3</sup>).

Por outro lado, como demonstrado na figura 14B, a análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta maior frequência de neutrófilos CD23<sup>+</sup> em relação ao grupo NI (NI=28,74/mm<sup>3</sup>; AS=38,67/mm<sup>3</sup>; ACT=43,46/mm<sup>3</sup>).

A análise dos dados mostrou ainda que a frequência de neutrófilos CD28<sup>+</sup> foi significativamente menor (figura 14C) no grupo ACT em relação aos grupos NI e AS (NI=82,98/mm<sup>3</sup>; AS=69,01/mm<sup>3</sup>; ACT=23,91/mm<sup>3</sup>).

Na figura 14D, a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta menor frequência de neutrófilos CD86<sup>+</sup> quando comparado aos grupos NI e AS (NI=49,87/mm<sup>3</sup>; AS=50,43/mm<sup>3</sup>; ACT=14,29/mm<sup>3</sup>).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta menor percentual de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> em relação ao grupo AS (Figura 14A) e de neutrófilos CD28<sup>+</sup> em relação ao grupo NI (Figura 14C), enquanto que o grupo AS apresenta um maior percentual de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> em relação aos grupos NI (Figura 14A).



**Figura 14:** Número de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, CD23<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, CD28<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> e CD86<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

A população de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> circulantes foi identificada através de aspectos morfológicos e imunofenotípicos utilizando-se os anticorpos monoclonais anti-HLA-DR anti-CD23<sup>+</sup>, anti-CD28<sup>+</sup> e anti-CD86<sup>+</sup> marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> na população de neutrófilos. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

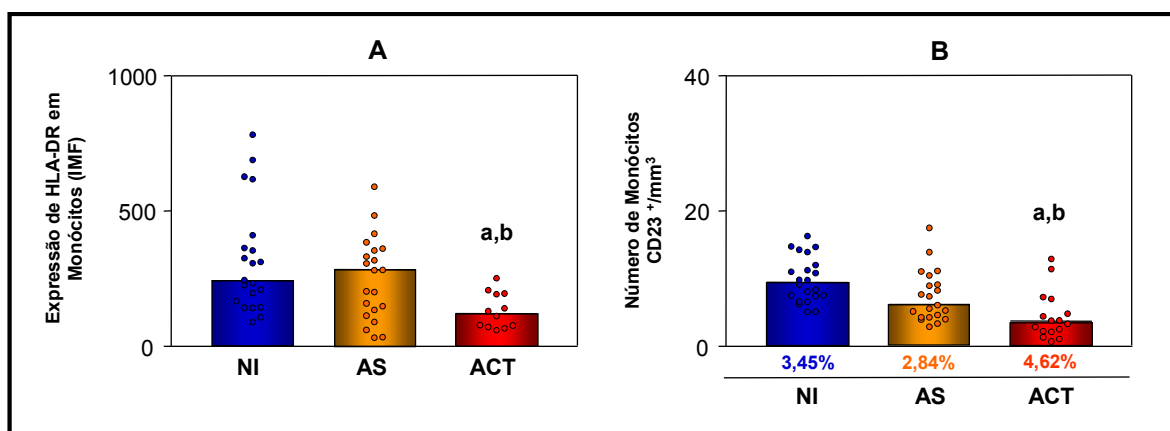
#### 4.1.3 - Aspectos fenotípicos de monócitos circulantes

##### 4.1.3.1 – Densidade de expressão de HLA-DR em monócitos e frequência de monócitos CD23<sup>+</sup>

A figura 15 mostra os resultados da densidade de expressão de HLA-DR em monócitos e a frequência de monócitos CD23<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT).

A análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta menor densidade de expressão de HLA-DR em monócitos (Figura 15A) quando comparado aos grupos NI e AS (NI=245,10; AS= 281,30; ACT=121,30).

Na figura 15B a análise dos dados demonstrou que o grupo ACT apresenta menor frequência ( $p < 0,05$ ) de monócitos  $CD23^+$  em relação aos grupos NI e AS (NI=9,47/mm<sup>3</sup>; AS=6,12/mm<sup>3</sup>; ACT=3,59/mm<sup>3</sup>).



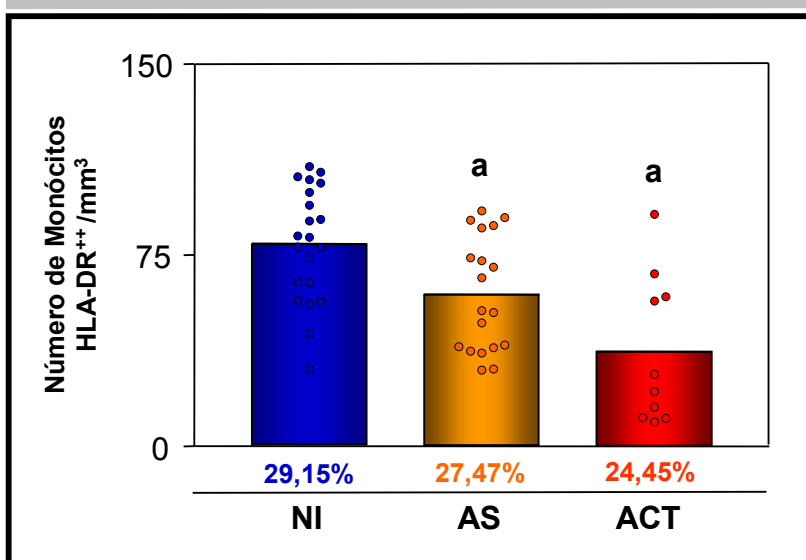
**Figura 15:** Análise da expressão da molécula HLA-DR em monócitos e número de monócitos  $CD23^+$ /mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

A população de monócitos  $HLA-DR^+$  e  $CD23^+$  circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-HLA-DR e anti- $CD23$  marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados estão expressos sob a forma de dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de HLA-DR e valores absolutos de monócitos  $CD23^+$  na população de monócitos. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

#### 4.1.3.2 - Frequência de monócitos pró-inflamatórios ( $HLA-DR^{++}$ )

A frequência de monócitos pró-inflamatórios ( $HLA-DR^{++}$ ) na população de monócitos do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT) está representada na figura 16.

A análise dos dados mostrou que os grupos AS e ACT apresentam uma frequência de monócitos pró-inflamatórios ( $HLA-DR^{++}$ ) significativamente menor em relação ao grupo NI (NI=82,08/mm<sup>3</sup>; AS=53,32/mm<sup>3</sup>; ACT=24,95/mm<sup>3</sup>).



**Figura 16:** Número de monócitos pró-inflamatórios HLA-DR<sup>++</sup>/mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=). A população de monócitos pró-inflamatórios circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-HLA-DR marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de monócitos HLA-DR<sup>++</sup> na população de monócitos. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

A análise da expressão de CD86 em monócitos não revelou diferenças significativas entre os grupos avaliados (NI= 82,30; AS= 75,74; ACT= 77,53).

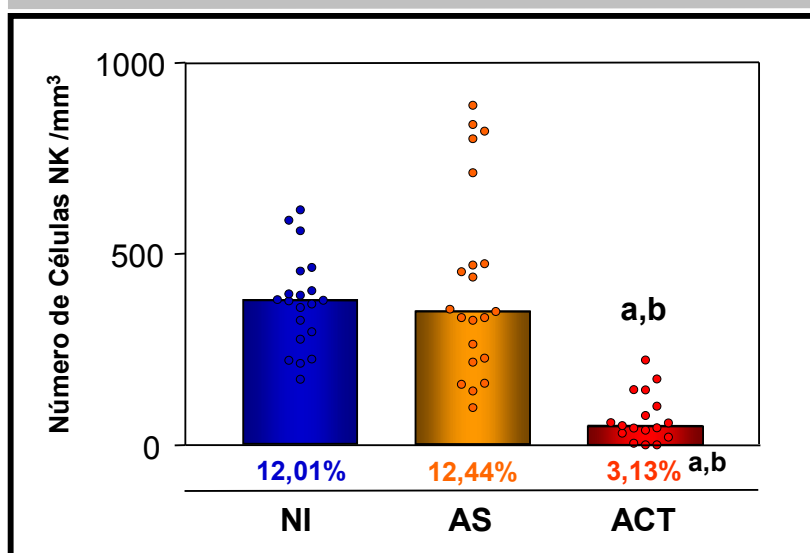
#### 4.1.4 - Aspectos fenotípicos de células NK circulantes

##### 4.1.4.1 - Freqüência de células NK

A figura 17 apresenta a freqüência de células NK na população de linfócitos do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT).

A análise dos dados permitiu observar uma menor freqüência de células NK no grupo ACT em relação aos grupos NI e AS (NI=378,98/mm<sup>3</sup>; AS=350,03/mm<sup>3</sup>; ACT=52,48/mm<sup>3</sup>).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados também demonstrou que o grupo ACT apresenta menor percentual de células NK em relação aos grupos NI e AS.



**Figura 17:** Número de células NK/mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●). A população de células NK circulantes foi, inicialmente, identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD16 marcado com FITC e anti-CD3 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de células NK na população de linfócitos. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

## **4.2- Caracterização de aspectos fenotípicos de células envolvidas na IMUNIDADE ADAPTATIVA de indivíduos assintomáticos e portadores de LV clássica: ênfase em linfócitos T e linfócitos B**

### **4.2.1 - Aspectos fenotípicos de linfócitos T circulantes**

#### *4.2.1.1 - Frequência de linfócitos T e subpopulações (linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup>)*

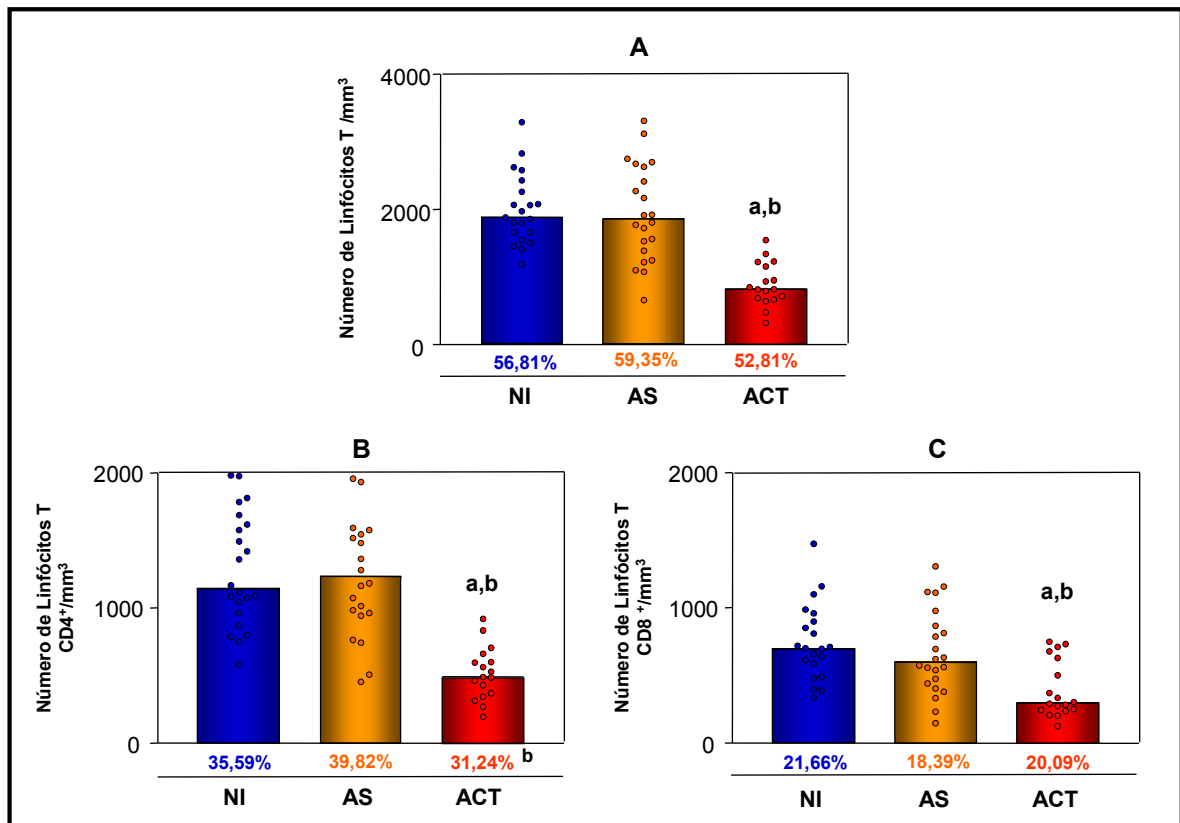
Os resultados da frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT) estão representados na figura 18A.

A análise dos resultados demonstrou que o grupo ACT apresenta uma menor frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) circulantes quando comparado aos grupos NI e AS (NI=1.881,58/mm<sup>3</sup>; AS=1.861,88/mm<sup>3</sup>; ACT=822,39/mm<sup>3</sup>).

As figuras 18B e 18C apresentam os resultados das frequências de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT).

A análise dos dados mostrou que tanto os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (NI=1.142,83/mm<sup>3</sup>; AS=1.233,41/mm<sup>3</sup>; ACT=491,96/mm<sup>3</sup>) quanto os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (NI=702,93/mm<sup>3</sup>; AS=599,58/mm<sup>3</sup>; ACT=298,09/mm<sup>3</sup>) contribuíram para a menor frequência de linfócitos T em ACT quando comparado aos grupos NI e AS.

Quanto aos dados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta menor percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em relação ao grupo AS (Figura 18B).



**Figura 18:** Número de linfócitos T/mm<sup>3</sup> (A), T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (B) e T CD8<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (C) no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

O número de linfócitos T foi estimado através do somatório dos valores das frequências das subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>). As subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram, inicialmente, identificadas através de aspectos morfométricos seguido pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 marcados com FITC e anti-CD3 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos das células T (A), T CD4<sup>+</sup> (B) e T CD8<sup>+</sup> (C) na população de linfócitos totais. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.



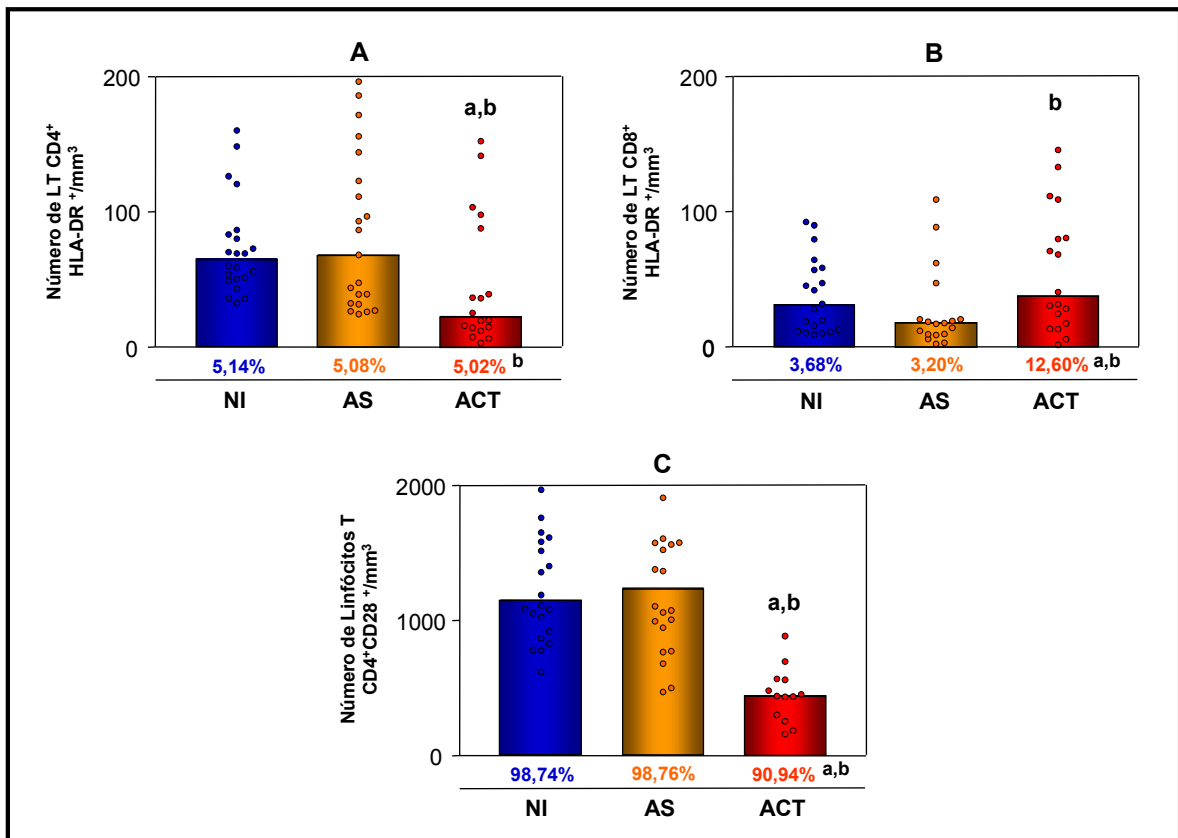
#### 4.2.1.2 - *Freqüência de linfócitos T ativados (CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando CD28*

A freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> e de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT) estão representados na figura 19.

A análise dos dados demonstrou que o grupo ACT apresenta uma menor freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> em relação aos grupos NI e AS (NI=64,65/mm<sup>3</sup>; AS=68,24/mm<sup>3</sup>; ACT=22,78/mm<sup>3</sup>). Contudo, em relação à freqüência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> o grupo ACT apresenta uma freqüência significativamente maior em relação ao grupo AS (NI=30,06/mm<sup>3</sup>; AS=17,53/mm<sup>3</sup>; ACT=36,06/mm<sup>3</sup>).

Observa-se também que o grupo ACT apresenta uma freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> significativamente menor (Figura 19C) do que os grupos NI e AS (NI=1.150,73/mm<sup>3</sup>; AS=1.236,09/mm<sup>3</sup>; ACT=442,31/mm<sup>3</sup>).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta menor percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> em relação ao grupo AS (Figura 19A) e maior percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> em relação aos grupos NI e AS (Figura 19B). Observa-se ainda que o grupo ACT apresenta menor percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> em relação aos grupos NI e AS (Figura 19C).



**Figura 19:** Número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (A), linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (B) e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (C) no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

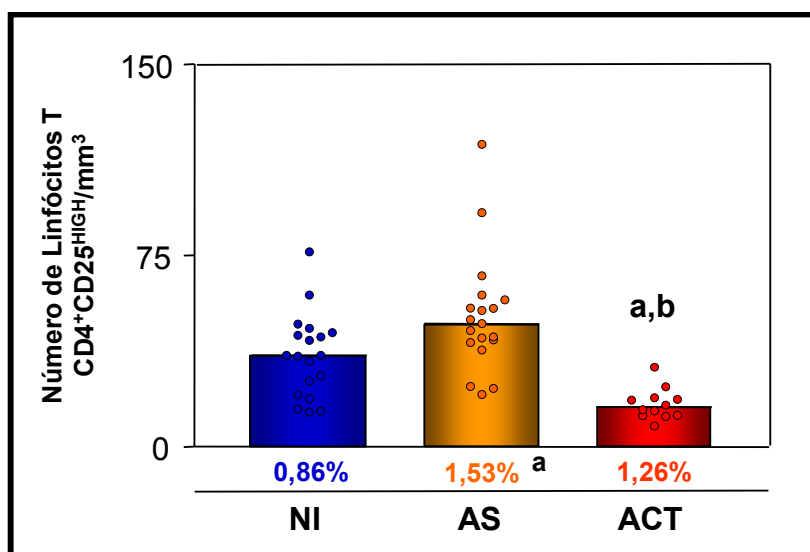
As subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativados e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> foram inicialmente identificadas através de aspectos morfométricos seguido pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 marcados com FITC e anti-HLA-DR e anti-CD28 marcados com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> ativados e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> na população de linfócitos. As medianas dos valores percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/CD4 e de linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/CD8 também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

#### 4.2.1.4 - Frequência de células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>)

A frequência de células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>) do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS), portadores de LV clássica (ACT) está representada na figura 20.

A análise dos dados demonstrou que o grupo ACT apresenta uma menor frequência de células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>) quando comparado aos grupos NI e AS (NI=35,90/mm<sup>3</sup>; AS=48,30/mm<sup>3</sup>; ACT=15,50/mm<sup>3</sup>).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo AS apresenta maior percentual de células T regulatórias ( $CD4^+CD25^{HIGH}$ ) em relação ao grupo NI.



**Figura 20:** Número de células T  $CD4^+CD25^{HIGH}/mm^3$  no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=○) e portadores de LV clássica (ACT=●). A população de linfócitos reguladores circulantes foi identificada em ensaios de dupla marcação utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 marcados com FITC e anti-CD25 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de células T  $CD4^+CD25^{HIGH}$  na população de linfócitos. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

## 4.2.2 - Aspectos fenotípicos de linfócitos B circulantes

### 4.2.2.1 - Frequência de linfócitos B e subpopulações de linfócitos B ( $CD5^-$ e $CD5^+$ )

A frequência de linfócitos B ( $CD3^+CD19^+$ ) no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT) está representada na figura 21A.

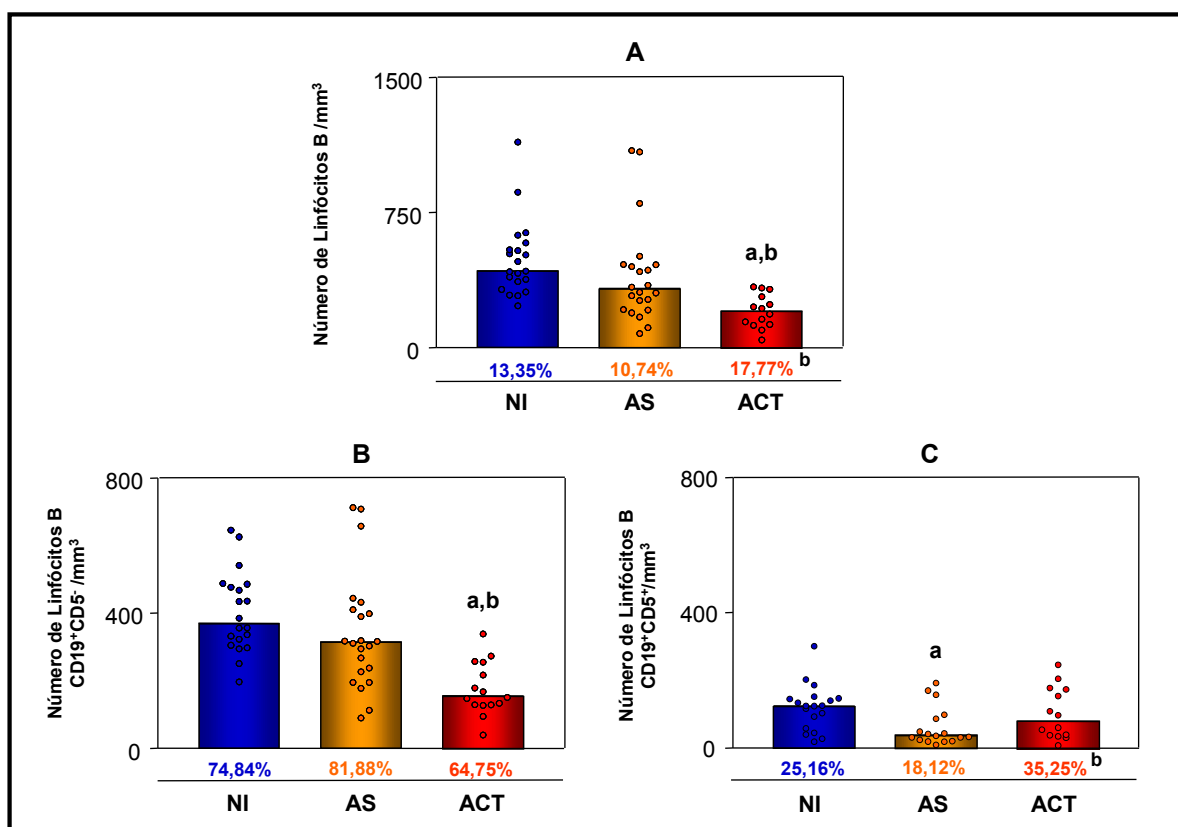
A análise dos dados demonstrou que o grupo ACT apresenta uma frequência de linfócitos B ( $CD3^+CD19^+$ ) significativamente menor do que os grupos NI e AS (NI=426,00/ $mm^3$ ; AS=323,48/ $mm^3$ ; ACT=203,53/ $mm^3$ ).

As figuras 21B e 21C apresentam os resultados da frequência de linfócitos B convencionais ( $CD19^+CD5^-$ ) e de linfócitos B1 ( $CD19^+CD5^+$ ) do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT).

Na figura 21B a análise dos dados demonstrou que o grupo ACT possui uma frequência de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>) convencionais significativamente menor do que os grupos NI e AS (NI=371,33/mm<sup>3</sup>; AS=314,31/mm<sup>3</sup>; ACT=151,66/mm<sup>3</sup>).

Como descrito na Figura 21C, os dados mostraram que o grupo AS apresenta uma frequência significativamente menor de linfócitos B1 (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) do que o grupo NI (NI=124,59/mm<sup>3</sup>; AS=39,04/mm<sup>3</sup>; ACT=84,66/mm<sup>3</sup>).

Os resultados obtidos em valores percentuais revelaram que o grupo ACT apresenta maior percentual de linfócitos B e da subpopulação B1 em relação ao grupo AS (Figura 21A e 21C, respectivamente).



**Figura 21:** Número de linfócitos B CD19<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (A), linfócitos B convencionais CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>/mm<sup>3</sup> (B) e linfócitos B1 CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (C) no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

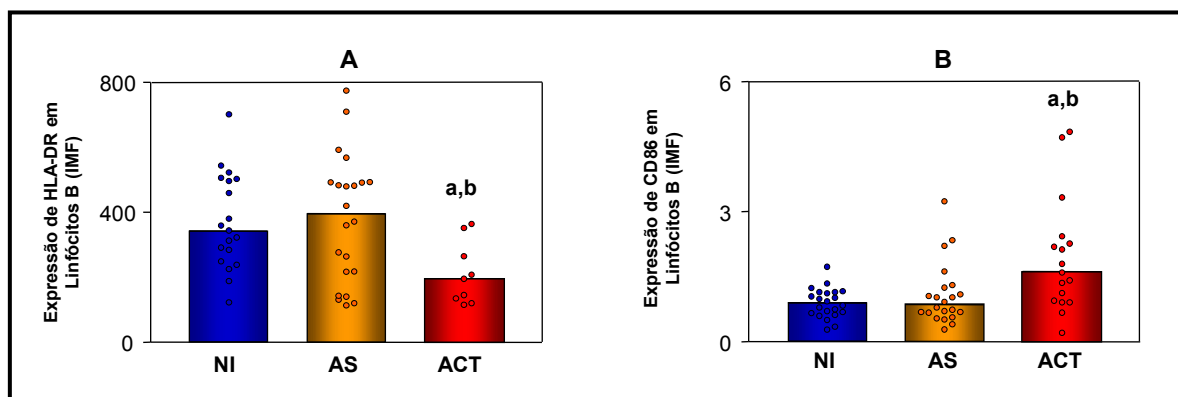
A população de linfócitos B circulantes foi inicialmente identificada através de aspectos morfológicos seguida pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 marcados com FITC e anti-CD3 marcado com PE. As populações de linfócitos B convencionais e linfócitos B1 foram, inicialmente, identificadas através de aspectos morfológicos seguido pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD5 marcado com FITC e anti-CD19 marcado com PE segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos dos linfócitos B, B convencionais e linfócitos B1 na população de linfócitos totais. As medianas dos valores percentuais de linfócitos B, linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>/B e de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>/B também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

#### 4.2.2.2 – Densidade de expressão de HLA-DR e CD86 em linfócitos B

A figura 22 mostra os resultados da densidade de expressão de HLA-DR e CD86 em linfócitos B do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT). Os dados foram apresentados em intensidade média de fluorescência.

A análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta uma menor densidade de expressão de HLA-DR em linfócitos B (Figura 22A) quando comparado aos grupos NI e AS (NI= 345,01; AS= 396,01; ACT=196,64).

Na figura 22B a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta uma maior densidade de expressão de CD86 em linfócitos B ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos grupos NI e AS (NI= 0,89; AS= 0,86; ACT= 1,60).



**Figura 22:** Análise da expressão da molécula HLA-DR e CD86 em linfócitos B no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

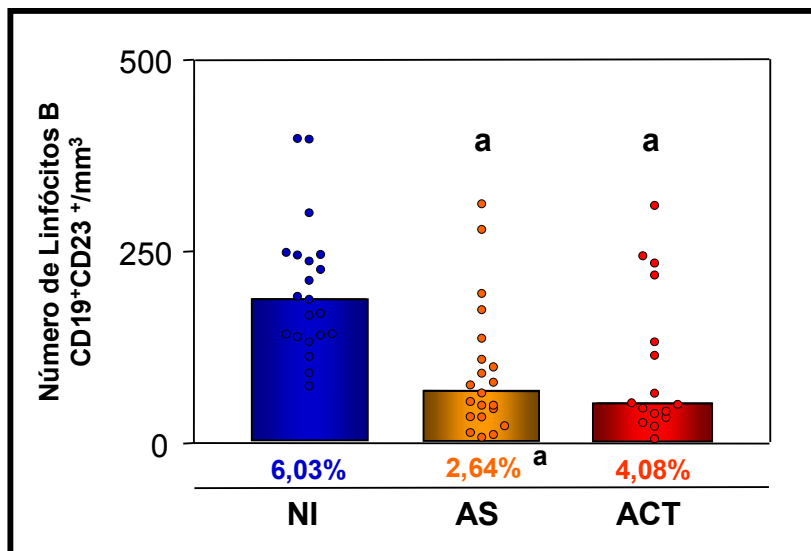
A população de linfócitos circulantes foi inicialmente identificada através de aspectos morfométricos seguida de análise imunofenotípica utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-HLA-DR e anti-CD86 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados estão expressos sob a forma de dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de HLA-DR e CD86 na população de linfócitos B. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

#### 4.2.2.3- Frequência de linfócitos B ( $CD19^+CD23^+$ )

A figura 23 demonstra a frequência de linfócitos B  $CD19^+CD23^+$  na população de linfócitos totais do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT).

A análise dos dados revelou que os grupos AS e ACT apresentam uma frequência de linfócitos B  $CD19^+CD23^+$  significativamente menor do que o grupo NI (NI=187,93/mm<sup>3</sup>; AS=66,12/mm<sup>3</sup>; ACT=52,23/mm<sup>3</sup>).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo AS apresenta menor percentual de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> em relação ao grupo NI.

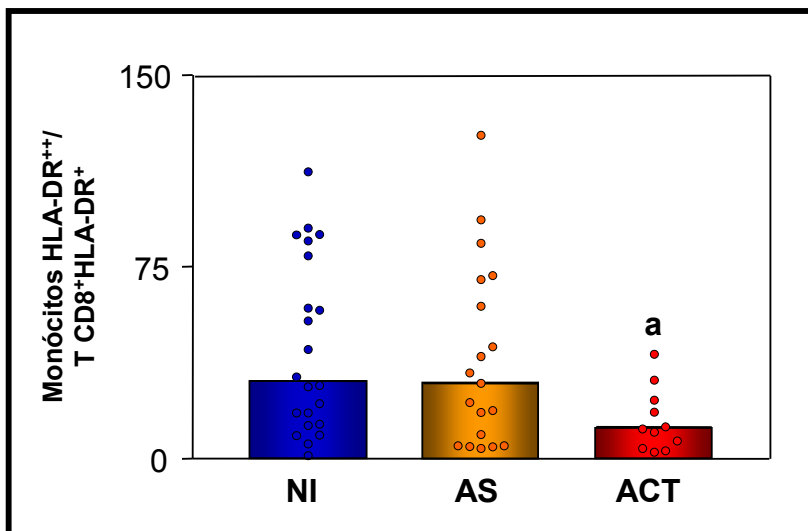


**Figura 23:** Número de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●). A população de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> circulantes foi identificada em ensaios de dupla marcação utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 marcados com FITIC e anti-CD23 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos dos linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> na população de linfócitos totais. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

#### 4.3- Balanço entre os principais aspectos da na imunidade inata e adaptativa de indivíduos assintomáticos e portadores de LV clássica

Visando investigar o balanço do envolvimento da resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por *Leishmania*, calculamos a razão entre os valores percentuais de monócitos pró-inflamatórios e linfócitos T CD8<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS), portadores de LV clássica (ACT). Os resultados dessa razão estão representados na figura 24.

A análise dos dados demonstrou que o grupo ACT apresenta uma razão entre monócitos pró-inflamatórios e linfócitos T CD8<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> significativamente menor do que o grupo NI (NI=30,39; AS=29,54; ACT=11,73).



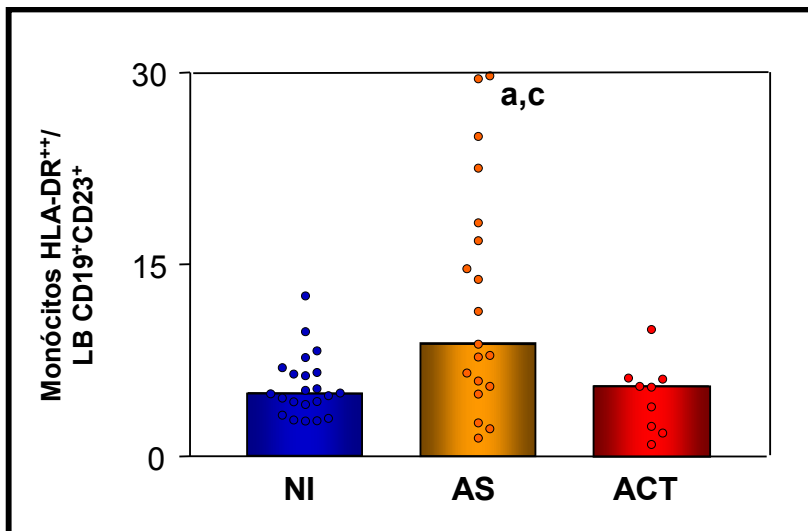
**Figura 24:** Razão entre monócitos HLA-DR<sup>++</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão de monócitos HLA-DR<sup>++</sup>/linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

Numa outra abordagem, realizamos uma análise adicional da razão entre os percentuais de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>) e linfócitos B ativados CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>.

Os resultados da razão entre os percentuais de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>) e linfócitos B ativados CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT) estão representados na figura 25.

A análise dos dados demonstrou que o grupo AS apresenta uma razão entre monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>) e linfócitos B ativados CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> significativamente maior do que os grupos NI e ACT (NI=4,93; AS=8,78; ACT=5,41).



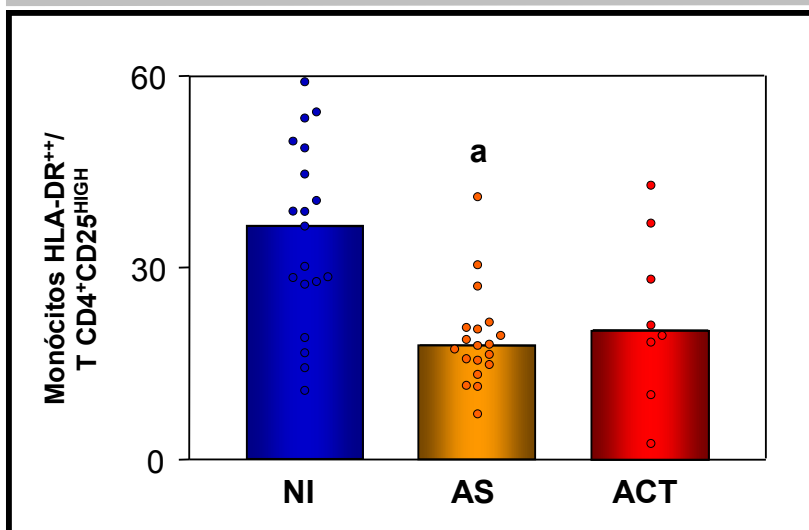
**Figura 25:** Razão entre monócitos HLA-DR<sup>++</sup> e linfócitos B ativados CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão de monócitos HLA-DR<sup>++</sup>/linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

Ainda nesse contexto, investigamos a razão entre os valores percentuais de monócitos pró-inflamatórios e células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>) do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT). Os resultados dessa razão estão representados na figura 26.

A análise dos dados demonstrou que o grupo AS apresenta uma razão entre monócitos pró-inflamatórios e células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>) significativamente menor do que o grupo NI (NI=36,51; AS=17,88; ACT=20,25).





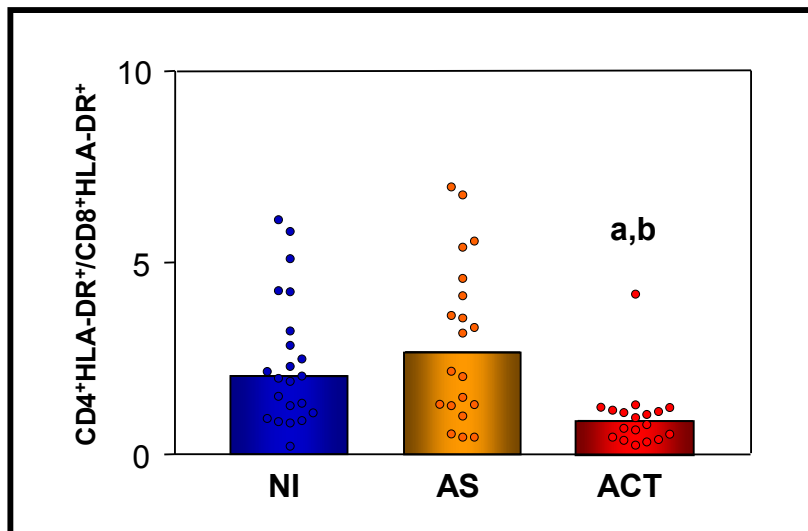
**Figura 26:** Razão entre monócitos HLA-DR<sup>++</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão de monócitos HLA-DR<sup>++</sup>/linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

Visando investigar o balanço da ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> durante a infecção por *Leishmania* realizamos uma análise adicional da razão entre as frequências de células CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>.

Os resultados da razão entre os linfócitos CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT) estão representados na figura 27.

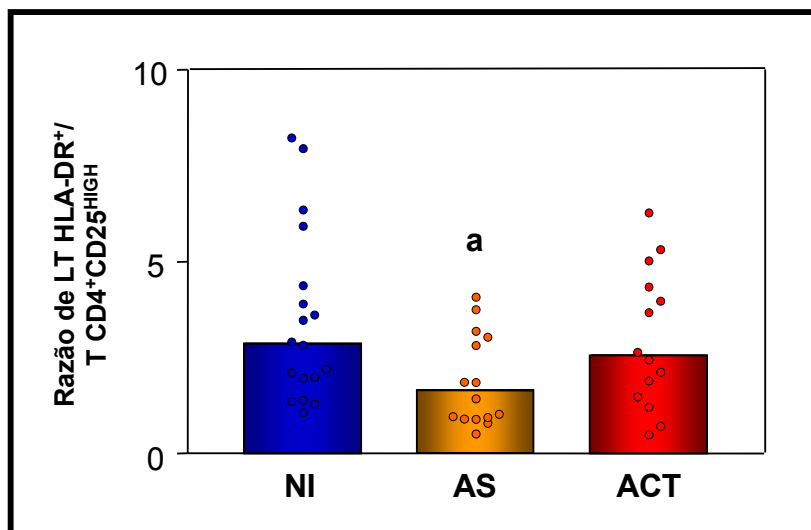
A análise dos dados revelou uma razão CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> significativamente menor no grupo ACT quando comparado com os grupos NI e AS (NI=2,02; AS=2,67; ACT=0,87).



**Figura 27:** Razão entre linfócitos T  $CD4^+HLA-DR^+/CD8^+HLA-DR^+$  no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=). Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão de linfócitos T  $HLA-DR^+CD4^+/CD8^+HLA-DR^+$ . As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

Além disso, investigamos a razão entre os valores percentuais de linfócitos T  $HLA-DR^+$  e células T reguladoras ( $CD4^+CD25^{HIGH}$ ) do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT). A figura 28 apresenta os resultados dessa razão.

A análise dos dados revelou que o grupo AS apresenta uma razão entre linfócitos T  $HLA-DR^+$  e linfócitos T  $CD4^+CD25^{HIGH}$  significativamente menor ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo NI (NI=2,87; AS=1,43; ACT= 2,55).

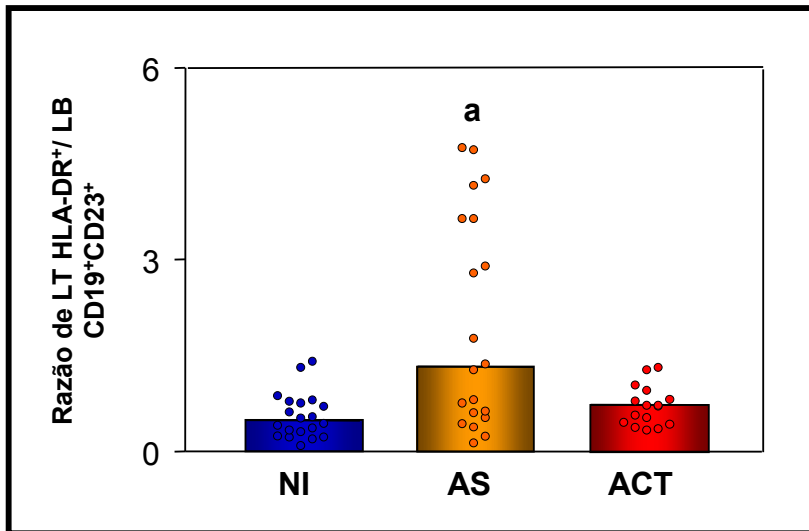


**Figura 28:** Razão entre linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão T HLA-DR<sup>+</sup>/T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

Numa abordagem final calculamos a razão entre os valores percentuais de linfócitos T ativados (CD4<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> + CD8<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>) e linfócitos B ativados (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV assintomática (AS) e portadores de LV clássica (ACT). A figura 29 apresenta os resultados dessa razão.

A análise dos dados revelou que o grupo AS apresenta uma razão entre linfócitos T ativados (CD4<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> + CD8<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>) e linfócitos B ativados (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) significativamente maior do que o grupo NI (NI=0,49; AS=1,33; ACT=0,72).



**Figura 29:** Razão entre linfócitos T ativados (HLA-DR<sup>+</sup>) e linfócitos B ativados (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV assintomática (AS=●) e portadores de LV clássica (ACT=●).

Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão de linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup>/linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, AS e ACT, respectivamente.

## **II - Efeito da terapêutica específica em aspectos imunofenotípicos associados à LV clássica**

### **4.4- Caracterização de aspectos fenotípicos de células envolvidas na IMUNIDADE INATA de indivíduos portadores de LV clássica e curados: ênfase em eosinófilos, neutrófilos, monócitos e células NK**

#### **4.4.1 - Aspectos fenotípicos de eosinófilos circulantes**

##### *4.4.1.1 - Frequência de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup>*

A figura 30 apresenta os resultados da frequência de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR).

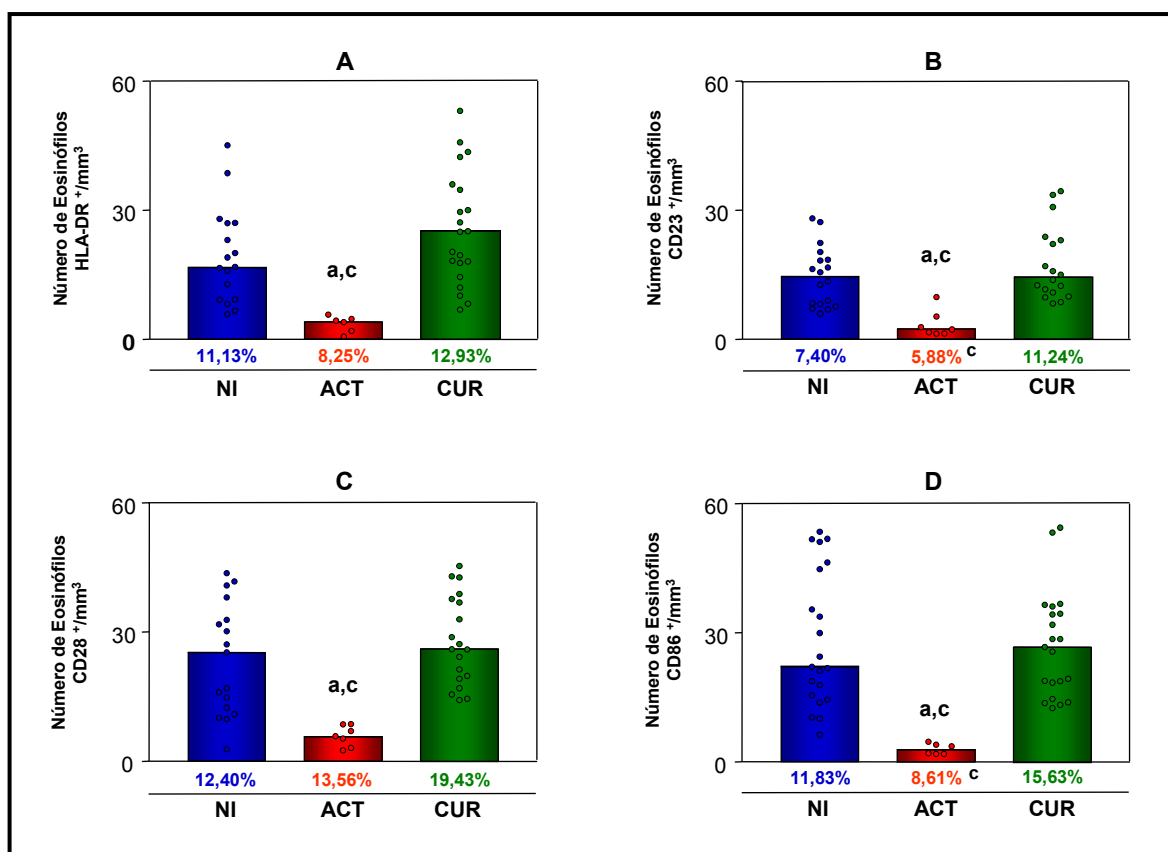
A análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta frequência de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup> significativamente menor (figura 30A) do que os grupos NI e CUR (NI=16,88/mm<sup>3</sup>; ACT=4,23/mm<sup>3</sup>; CUR=25,01/mm<sup>3</sup>).

Como demonstrado na figura 30B, a análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta menor frequência de eosinófilos CD23<sup>+</sup> em relação aos grupos NI e CUR (NI=14,60/mm<sup>3</sup>; ACT=2,37/mm<sup>3</sup>; CUR=14,46/mm<sup>3</sup>).

Observa-se também menor frequência de eosinófilos CD28<sup>+</sup> (figura 30C) no grupo ACT em relação aos grupos NI e CUR (NI=25,35/mm<sup>3</sup>; ACT=5,86/mm<sup>3</sup>; CUR=26,06/mm<sup>3</sup>).

Na figura 30D a análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta frequência de eosinófilos CD86<sup>+</sup> significativamente menor em relação aos grupos NI e CUR (NI=22,11/mm<sup>3</sup>; ACT=2,87/mm<sup>3</sup>; CUR=26,75/mm<sup>3</sup>).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta menor percentual de eosinófilos CD23<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> em relação ao grupo CUR (Figura 30B e D, respectivamente).



**Figura 30:** Número de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, CD23<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, CD28<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> e CD86<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

A população de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-HLA-DR anti-CD23<sup>+</sup>, anti-CD28<sup>+</sup> e anti-CD86<sup>+</sup> marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de eosinófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> na população de eosinófilos. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

#### 4.4.2 - Aspectos fenotípicos de neutrófilos circulantes

##### 4.4.2.1 - Frequência de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup>

A figura 31 apresenta a frequência de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR).

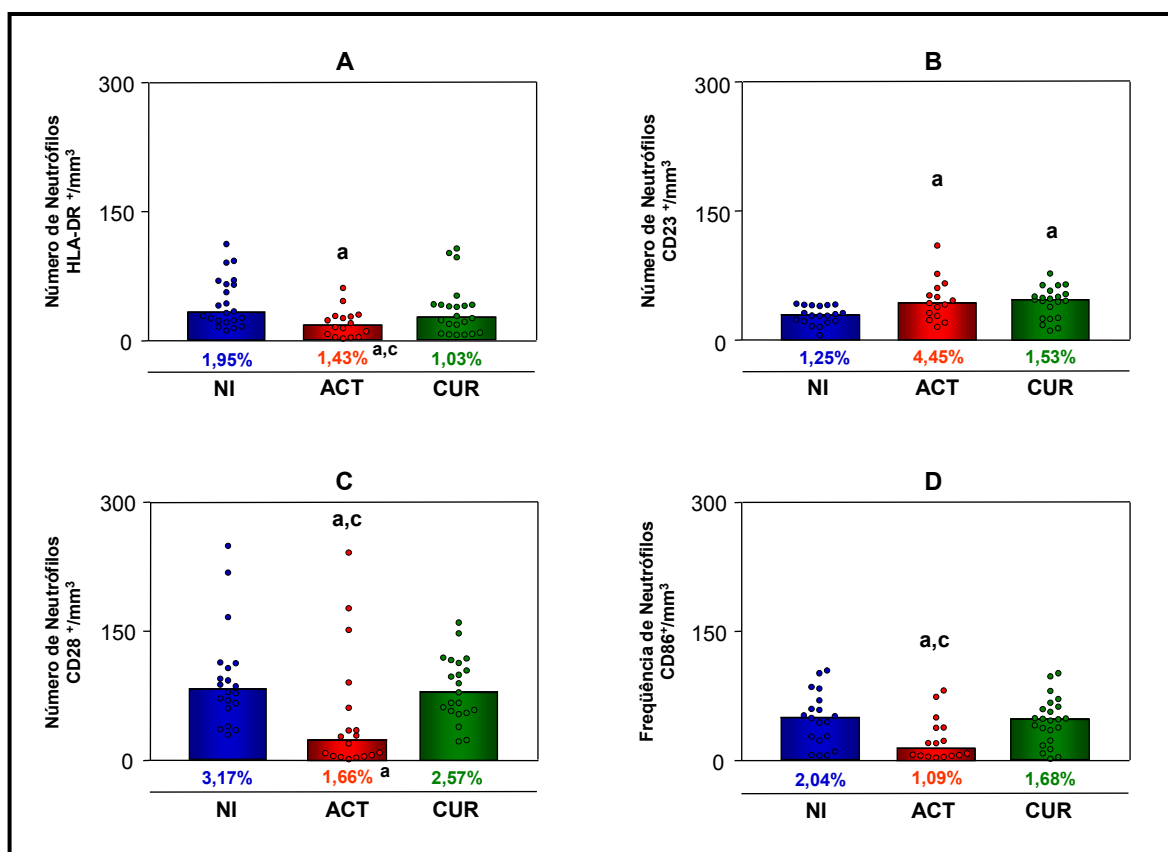
Na figura 31A a análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta menor frequência de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> quando comparado ao grupo NI (NI=33,49/mm<sup>3</sup>; ACT=17,76/mm<sup>3</sup>; CUR=27,79/mm<sup>3</sup>).

Por outro lado, como demonstrado na figura 31B, a análise dos dados mostrou que os grupos CUR e ACT apresentam uma frequência de neutrófilos CD23<sup>+</sup> significativamente maior em relação ao grupo NI (NI=28,74/mm<sup>3</sup>; ACT=43,46/mm<sup>3</sup>; CUR=47,19/mm<sup>3</sup>).

A análise dos resultados mostrou ainda que o grupo ACT apresenta menor frequência de neutrófilos CD28<sup>+</sup> (figura 31C) em comparação aos grupos NI e CUR (NI=82,98/mm<sup>3</sup>; ACT=23,91/mm<sup>3</sup>; CUR=79,12/mm<sup>3</sup>).

Na figura 31D a análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta uma frequência de neutrófilos CD86<sup>+</sup> significativamente menor do que os grupos NI e CUR (NI=49,87/mm<sup>3</sup>; ACT=14,29/mm<sup>3</sup>; CUR=48,15/mm<sup>3</sup>).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta menor percentual de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> em relação ao grupo NI e maior percentual de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> em relação ao grupo CUR (Figura 31A). A análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta menor percentual de neutrófilos CD28<sup>+</sup> em relação ao grupo NI (Figura 31C).



**Figura 31:** Número de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, CD23<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, CD28<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> e CD86<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

A população de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-HLA-DR anti-CD23<sup>+</sup>, anti-CD28<sup>+</sup> e anti-CD86<sup>+</sup> marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> na população de neutrófilos. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

#### 4.4.3 - Aspectos fenotípicos de monócitos circulantes

##### 4.4.3.1 – Densidade de expressão de HLA-DR em monócitos e frequência de monócitos CD23<sup>+</sup>

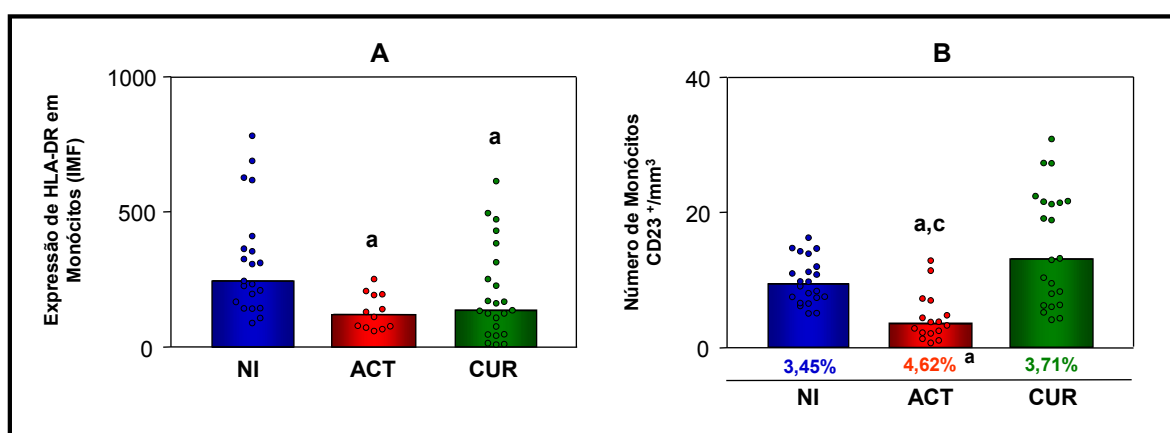
A figura 32 mostra os resultados da densidade de expressão de HLA-DR em monócitos e a frequência de monócitos CD23<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR). Os dados foram apresentados em intensidade média de fluorescência.



A análise dos dados revelou que os grupos ACT e CUR apresentam uma menor densidade de expressão de HLA-DR (Figura 32A) em monócitos quando comparado ao grupo NI (NI= 245,10; ACT= 121,30; CUR= 135,35).

Na figura 32B a análise dos dados mostrou uma menor frequência de monócitos CD23<sup>+</sup> no grupo ACT em relação aos grupos NI e CUR (NI=9,47/mm<sup>3</sup>; ACT=3,59/mm<sup>3</sup>; CUR=13,14/mm<sup>3</sup>).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta maior percentual de monócitos CD23<sup>+</sup> em relação ao grupo NI (Figura 32B).



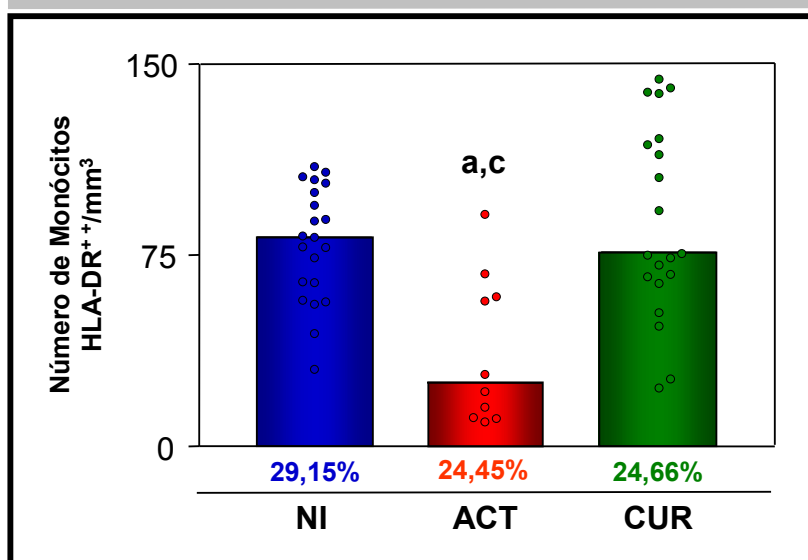
**Figura 32:** Análise da expressão da molécula HLA-DR em monócitos e número de monócitos CD23<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

A população de monócitos HLA-DR<sup>+</sup> e CD23<sup>+</sup> circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-HLA-DR e anti-CD23 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados estão expressos sob a forma de dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de HLA-DR e valores absolutos de monócitos CD23<sup>+</sup> na população de monócitos. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

#### 4.4.3.2 - Frequência de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>)

A figura 33 apresenta a frequência de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>) na população de monócitos do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR).

A análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta uma menor frequência de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>) quando comparado aos grupos NI e CUR (NI=82,08/mm<sup>3</sup>; ACT=24,95/mm<sup>3</sup>; CUR=75,37/mm<sup>3</sup>).



**Figura 33:** Número de monócitos pró-inflamatórios HLA-DR<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

A população de monócitos pró-inflamatórios circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-HLA-DR marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de monócitos HLA-DR<sup>+</sup> na população de monócitos. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

A análise da expressão de CD86 em monócitos não revelou diferenças significativas entre os grupos avaliados (NI= 82,30; ACT= 77,53; CUR= 71,10).

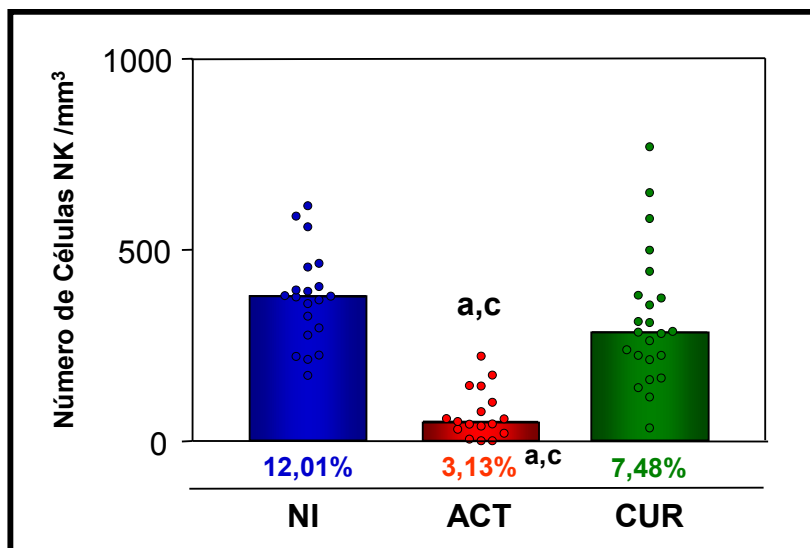
#### 4.4.4 - Aspectos fenotípicos de células NK circulantes

##### 4.4.4.1 - Frequência de células NK

A frequência de células NK na população de linfócitos do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR) está representado na figura 34.

A análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta uma menor frequência de células NK quando comparado aos grupos NI e CUR (NI=378,98/mm<sup>3</sup>; ACT=52,48/mm<sup>3</sup>; CUR=285,62/mm<sup>3</sup>).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo ACT também apresenta menor percentual de células NK em relação aos grupos NI e CUR.



**Figura 34:** Número de células NK/mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

A população de células NK circulantes foi, inicialmente, identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD16 marcado com FITC e anti-CD3 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de células NK na população de linfócitos. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

#### 4.5- Caracterização de aspectos fenotípicos de células envolvidas na IMUNIDADE ADAPTATIVA de indivíduos portadores de LV clássica e curados: ênfase em linfócitos T e linfócitos B

##### 4.5.1 - Aspectos fenotípicos de linfócitos T circulantes

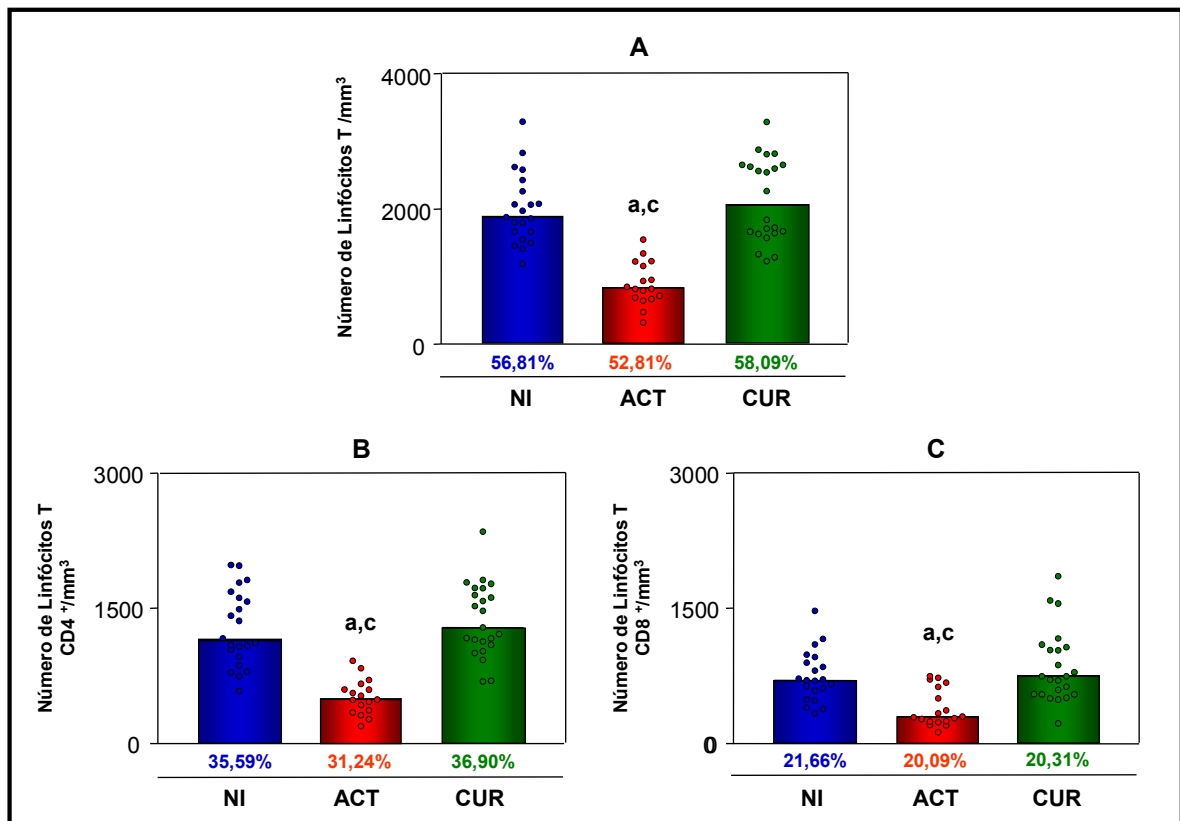
##### 4.5.1.1 - Frequência de linfócitos T e subpopulações (linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup>)

Os resultados da frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR) estão representados na figura 35A.

A análise dos resultados demonstrou que o grupo ACT apresenta uma menor frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) circulantes quando comparado aos grupos NI e CUR (NI=1.881,58/mm<sup>3</sup>; ACT=822,39/mm<sup>3</sup>; CUR=2.054,08/mm<sup>3</sup>).

As figuras 35B e 35C apresentam os resultados das freqüências de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na população de linfócitos do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR).

A análise dos resultados demonstrou que o grupo ACT apresenta uma freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (NI=1.142,83/mm<sup>3</sup>; ACT=491,96/mm<sup>3</sup>; CUR=1.288,31/mm<sup>3</sup>) e CD8<sup>+</sup> (NI=702,93/mm<sup>3</sup>; ACT=298,09/mm<sup>3</sup>; CUR=748,90/mm<sup>3</sup>) significativamente menor quando comparado aos grupos NI e CUR.



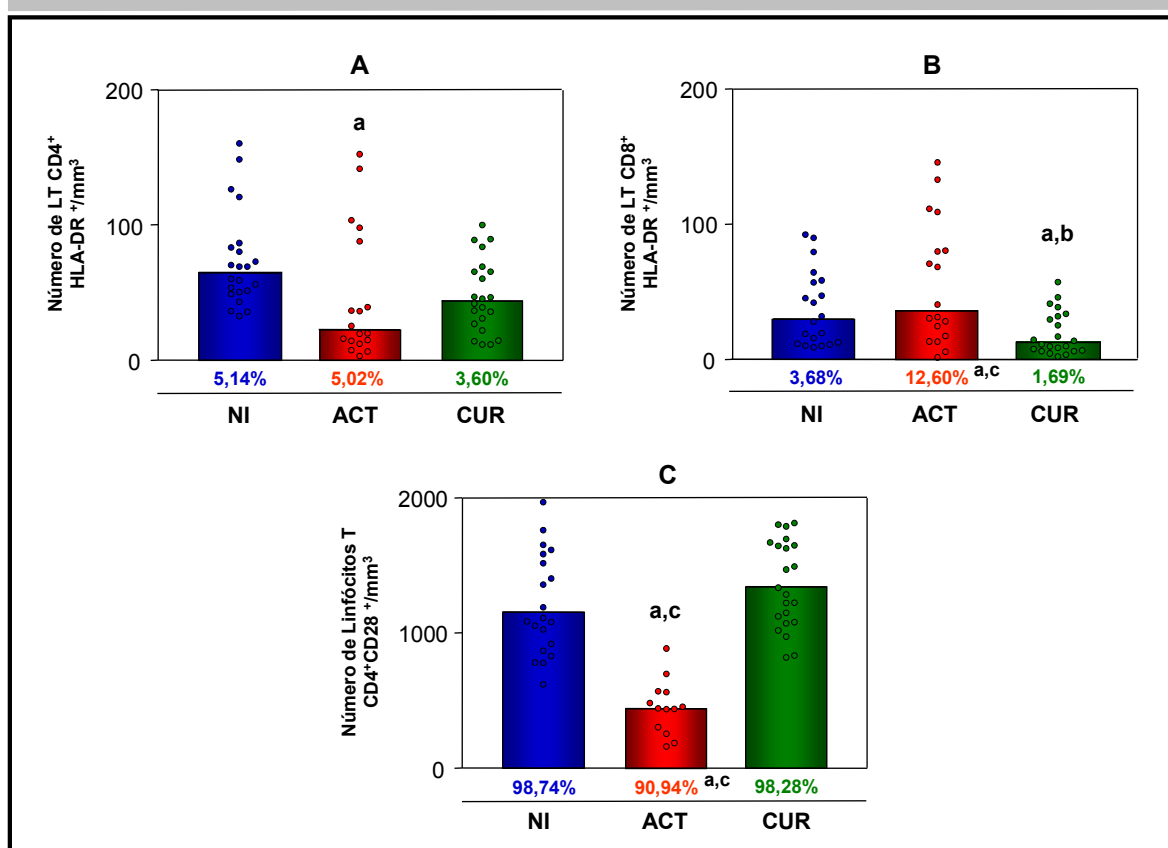
**Figura 35:** Número de linfócitos T/mm<sup>3</sup> (A), T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (B) e T CD8<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (C) no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●). O número de linfócitos T foi estimado através do somatório dos valores das freqüências das subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>). As subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram, inicialmente, identificadas através de aspectos morfométricos seguido pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 marcados com FITC e anti-CD3 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos das células T (A), T CD4<sup>+</sup> (B) e T CD8<sup>+</sup> (C) na população de linfócitos totais. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

#### 4.5.1.2 - *Freqüência de linfócitos T ativados (CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando CD28*

A freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> e de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> na população de linfócitos do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR) estão representados na figura 36.

A análise dos dados demonstrou que o grupo ACT apresenta menor freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> (NI=64,65/mm<sup>3</sup>; ACT=22,78/mm<sup>3</sup>; CUR=43,78/mm<sup>3</sup>) em relação ao grupo NI. Quanto à freqüência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>, o grupo CUR apresenta uma freqüência significativamente menor em relação aos grupos NI e ACT (NI=30,06/mm<sup>3</sup>; ACT=36,06/mm<sup>3</sup>; CUR=12,53/mm<sup>3</sup>). A análise dos dados mostrou uma menor freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (NI=1.150,73/mm<sup>3</sup>; ACT=442,31/mm<sup>3</sup>; CUR=1.336,33/mm<sup>3</sup>) no grupo ACT quanto comparado aos grupos NI e CUR.

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta maior percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> em relação aos grupos NI e CUR (figura 36B). Obseva-se ainda que o grupo ACT apresenta menor percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> em relação aos grupos NI e CUR (figura 36C).



**Figura 36:** Número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (A), linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (B) e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (C) no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

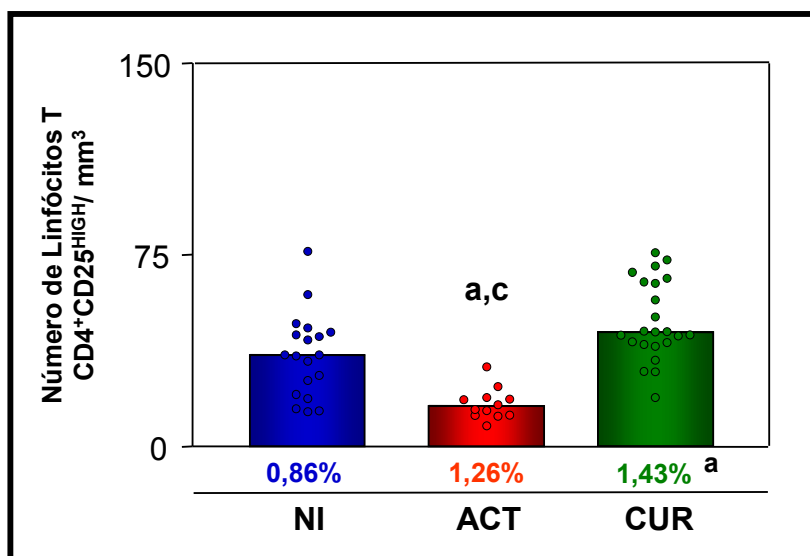
As subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativados e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> foram inicialmente identificadas através de aspectos morfométricos seguido pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 marcados com FITC e anti-HLA-DR e anti-CD28 marcados com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> nas populações de linfócitos. As medianas dos valores percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/CD4 e de linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/CD8 também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

#### 4.5.1.4 - Frequência de células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>)

A figura 37 apresenta a frequência de células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>) na população de linfócitos do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR).

A análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta uma menor frequência de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>) em relação aos grupos NI e CUR (NI=35,90/mm<sup>3</sup>; ACT=15,50/mm<sup>3</sup>; CUR=44,94/mm<sup>3</sup>).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo CUR apresenta maior percentual de células T reguladoras ( $CD4^+CD25^{HIGH}$ ) em relação ao grupo NI.



**Figura 37:** Número de células T regulatórias  $CD4^+CD25^{HIGH}/mm^3$  no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

A população de linfócitos regulatórios circulantes foi identificada em ensaios de dupla marcação utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 marcados com FITIC e anti-CD25 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos de células  $TCD4^+CD25^{HIGH}$  na população de linfócitos. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

#### 4.5.2 - Aspectos fenotípicos de linfócitos B circulantes

##### 4.5.2.1 - Frequência de população de linfócitos B e subpopulações de linfócitos B ( $CD5^-$ e $CD5^+$ )

A figura 38A apresenta os resultados da frequência de linfócitos B ( $CD3^-CD19^+$ ) na população de linfócitos do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR).

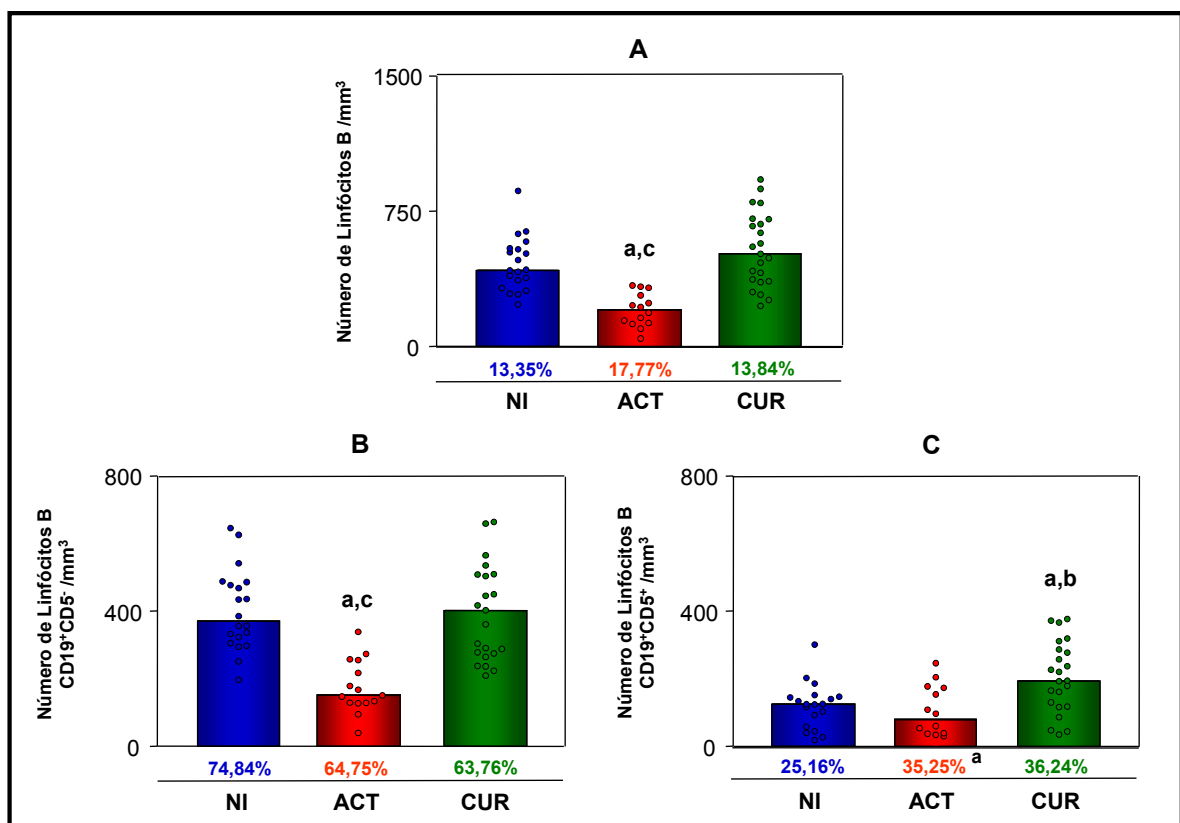
A análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta uma menor frequência de linfócitos B ( $CD3^-CD19^+$ ) em comparação aos grupos NI e CUR (NI=426,00/mm<sup>3</sup>; ACT=203,53/mm<sup>3</sup>; CUR=513,86/mm<sup>3</sup>).

Os resultados da frequência de linfócitos B convencionais ( $CD19^+CD5^-$ ) e de linfócitos B1 ( $CD19^+CD5^+$ ) no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), curados (CUR) e portadores de LV clássica (ACT) estão representados nas figuras 38B e 38C, respectivamente.

A análise dos dados demonstrou que o grupo ACT possui uma menor frequência de linfócitos B (Figura 38B) convencionais em relação aos grupos NI e CUR (NI= $371,33/mm^3$ ; ACT= $151,66/mm^3$ ; CUR= $402,77/mm^3$ ).

Na figura 38C a análise dos resultados mostrou que o grupo CUR apresenta uma maior frequência de linfócitos B1 em relação aos grupos NI e ACT (NI= $124,59/mm^3$ ; ACT= $84,66/mm^3$ ; CUR= $194,53/mm^3$ ).

Quanto aos resultados obtidos em valores percentuais, a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta maior percentual de linfócitos B1 em relação ao grupo NI (Figura 40C).



**Figura 38:** Número de linfócitos B  $CD19^+/mm^3$  (A), B convencionais  $CD19^+CD5^-/mm^3$  (B) e linfócitos B1  $CD19^+CD5^+/mm^3$  (C) no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

A população de linfócitos B circulantes foi inicialmente identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 marcados com FITC e anti-CD3 marcado com PE. As populações de linfócitos B convencionais e linfócitos B1 foram, inicialmente, identificadas através de aspectos morfométricos seguido pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD5 marcado com FITC e anti-CD19 marcado com PE segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores



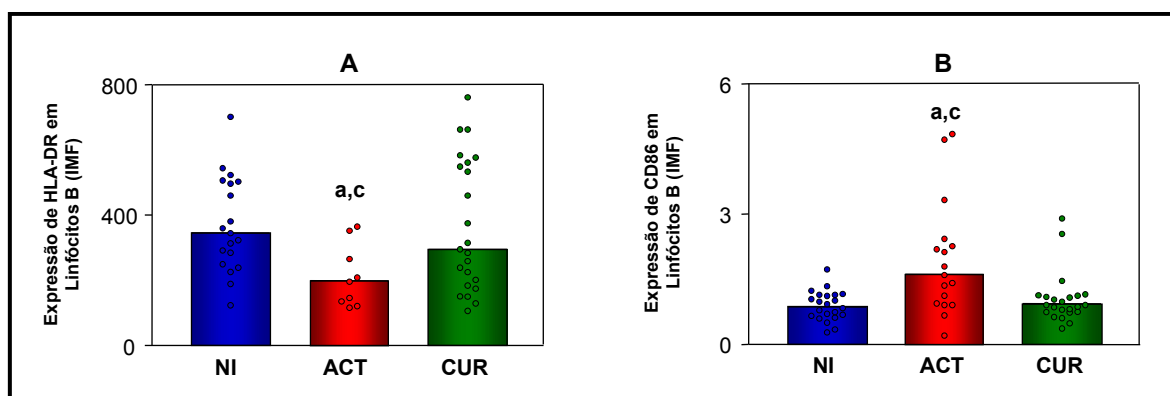
absolutos dos linfócitos B, B convencionais e linfócitos B1 na população de linfócitos. As medianas dos valores percentuais de linfócitos B, linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>/B e de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>/B também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

#### 4.5.2.2 – Densidade de expressão de HLA-DR e CD86 em linfócitos B

A figura 39 mostra os resultados da densidade de expressão de HLA-DR e CD86 em linfócitos B do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR). Os dados foram apresentados em intensidade média de fluorescência.

A análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta uma menor densidade de expressão de HLA-DR em linfócitos B (Figura 39A) quando comparado aos grupos NI e CUR (NI= 345,01; ACT= 196,64; CUR= 295,09).

Na figura 39B a análise dos dados revelou que o grupo ACT apresenta uma maior densidade de expressão de CD86 em linfócitos B quando comparado aos grupos NI e CUR (NI= 0,89; ACT= 1,60; CUR= 0,91).

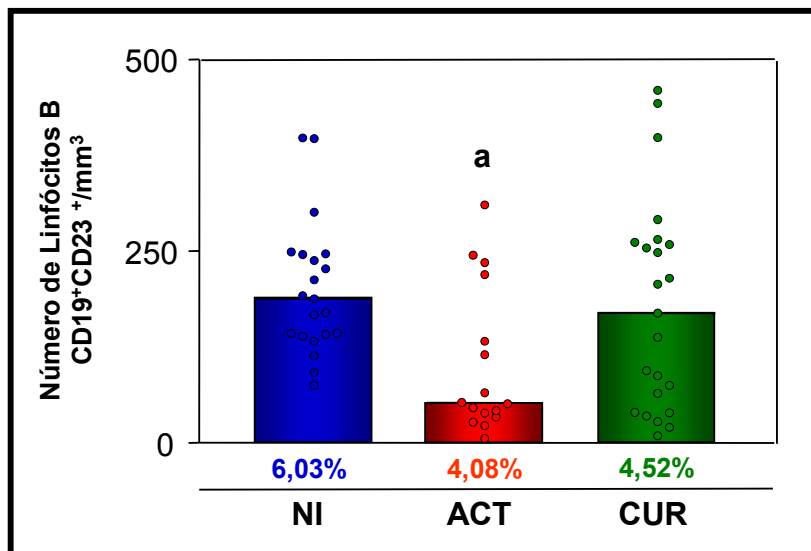


**Figura 39:** Análise da expressão da molécula HLA-DR e CD86 em linfócitos B no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●). A população de linfócitos circulantes foi inicialmente identificada através de aspectos morfológicos seguida de análise imunofenotípica utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-HLA-DR e anti-CD86 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados estão expressos sob a forma de dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de HLA-DR e CD86 na população de linfócitos B. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

#### 4.5.2.3 - Frequência de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>)

Os resultados da frequência de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> na população de linfócitos totais do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR) estão representados na figura 40.

A análise dos resultados mostrou que o grupo ACT apresenta uma menor frequência de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> em relação ao grupo NI (NI=187,93/mm<sup>3</sup>; ACT=52,23/mm<sup>3</sup>; CUR=169,19/mm<sup>3</sup>).



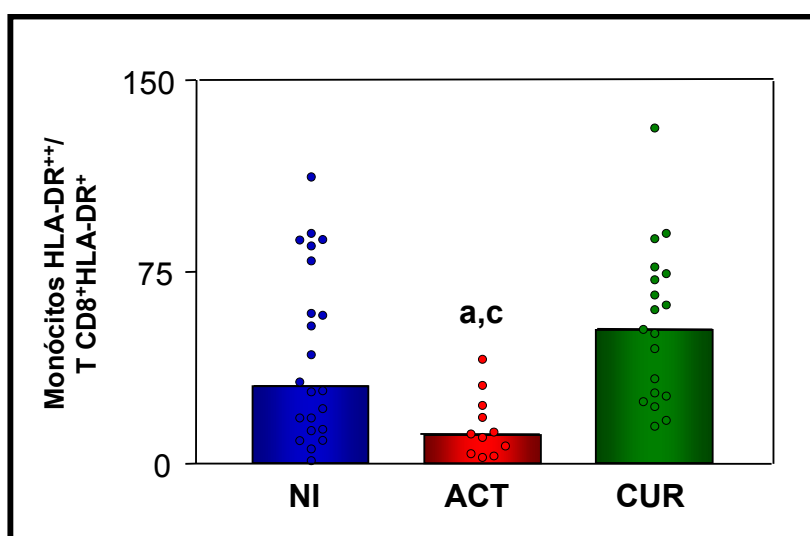
**Figura 40:** Número de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

A população de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> circulantes foi identificada em ensaios de dupla marcação utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 marcados com FITC e anti-CD23 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em População e Metodologia. Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores absolutos dos linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> na população de linfócitos totais. As medianas dos valores percentuais também estão representadas na figura. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

#### 4.6- Balanço entre os principais aspectos da na imunidade inata e adaptativa associados ao tratamento etiológico da LV clássica

Visando investigar o balanço do envolvimento da resposta imune inata e adaptativa após a terapêutica específica, calculamos a razão entre os valores percentuais de monócitos pró-inflamatórios e linfócitos T CD8<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR). Os resultados estão representados na figura 41.

A análise dos resultados mostrou que o grupo ACT apresenta uma razão entre monócitos pró-inflamatórios e linfócitos T CD8<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> significativamente menor do que os grupos NI e CUR (NI=30,39; ACT=11,73; CUR=52,67).

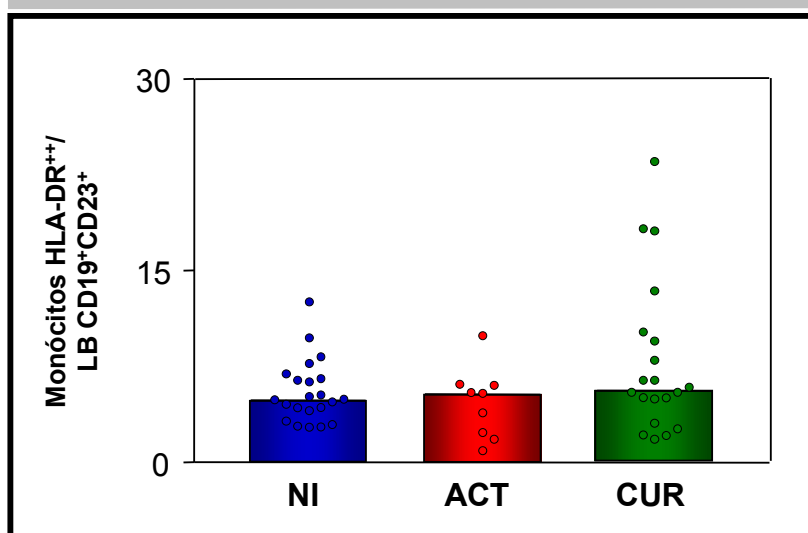


**Figura 41:** Razão entre monócitos HLA-DR<sup>++</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●). Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão de monócitos HLA-DR<sup>++</sup>/linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>. As letras a, b, c representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

Numa outra abordagem, realizamos uma análise adicional da razão entre os percentuais de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>) e linfócitos B ativados CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>.

A figura 42 demonstra a razão entre os percentuais de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR<sup>++</sup>) e linfócitos B ativados CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR).

A análise dos dados mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados (NI=4,93; ACT=5,41; CUR=5,70).

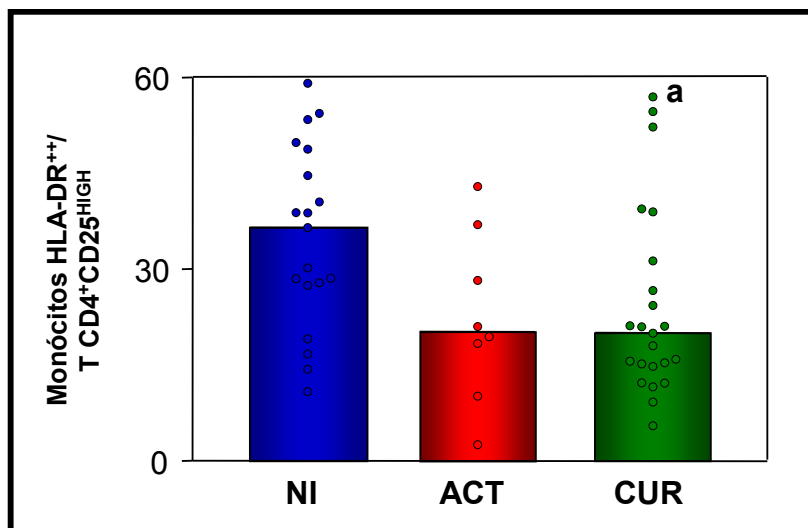


**Figura 42:** Razão entre monócitos HLA-DR<sup>++</sup> e linfócitos B ativados CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão de monócitos HLA-DR<sup>++</sup>/ linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>.

Ainda nesse contexto, investigamos a razão entre os valores percentuais de monócitos pró-inflamatórios e células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>) do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR). Os resultados dessa razão estão representados na figura 43.

A análise dos resultados mostrou que o grupo CUR apresenta uma menor razão entre monócitos pró-inflamatórios e células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>) em comparação ao grupo NI (NI=36,51; ACT=20,25; CUR=20,01).

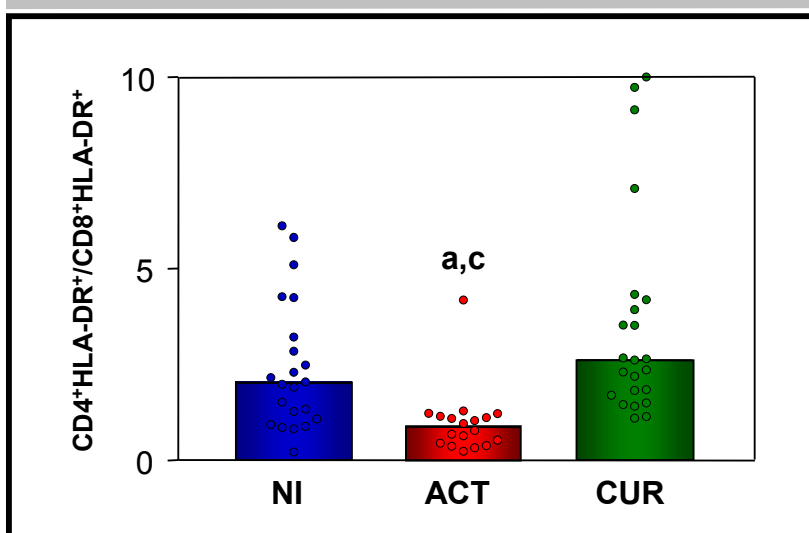


**Figura 43:** Razão entre monócitos HLA-DR<sup>++</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●). Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão de monócitos HLA-DR<sup>++</sup>/linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

Visando investigar o balanço da ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> após a terapêutica específica, realizamos uma análise adicional da razão entre células CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>.

A figura 44 apresenta os resultados da razão entre os linfócitos CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR).

A análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta uma menor razão CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> em relação aos grupos NI e CUR (NI=2,02; ACT=0,87; CUR=2,62).

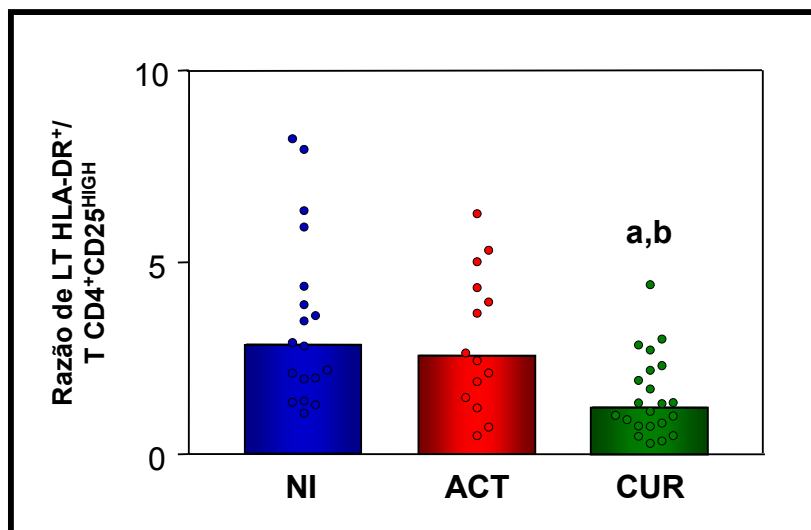


**Figura 44:** Razão entre linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão de linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

Além disso, investigamos a razão entre os valores percentuais de linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup> e células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>) do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR). A figura 45 apresenta os resultados dessa razão.

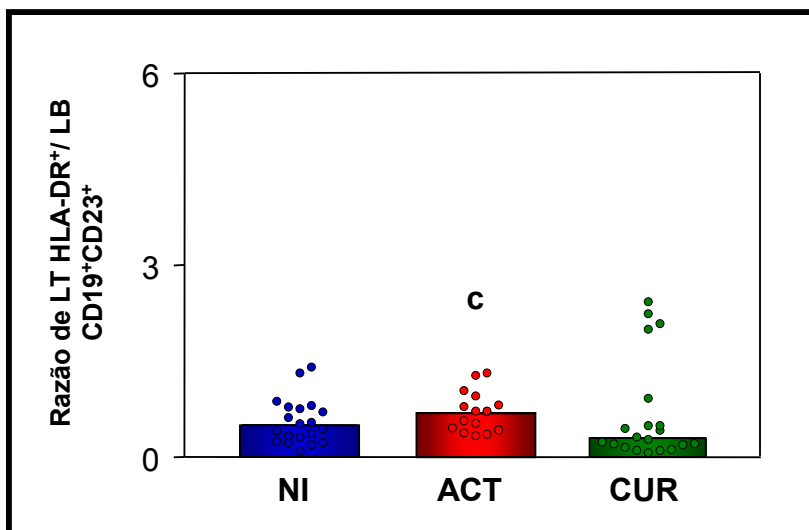
A análise dos dados revelou que o grupo CUR apresenta uma razão entre linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> significativamente menor do que os grupos NI e ACT (NI=2,87; ACT= 2,55; CUR=1,22).



**Figura 45:** Razão entre linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●). Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão T HLA-DR<sup>+</sup>/T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.

Numa abordagem final calculamos a razão entre os valores percentuais de linfócitos T ativados (CD4<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> + CD8<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>) e linfócitos B ativados (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) do sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI), portadores de LV clássica (ACT) e curados (CUR). A figura 47 apresenta os resultados dessa razão.

A análise dos dados mostrou que o grupo ACT apresenta uma razão entre linfócitos T ativados (CD4<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> + CD8<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>) e linfócitos B ativados (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que o grupo CUR (NI=0,49; ACT=0,72; CUR=0,30).



**Figura 46:** Razão entre linfócitos T ativados (HLA-DR<sup>+</sup>) e linfócitos B ativados (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) no sangue periférico de indivíduos não-infectados (NI=●), portadores de LV clássica (ACT=●) e curados (CUR=●).

Os resultados são expressos como dispersão de valores individuais (símbolos) e medianas (barras) dos valores percentuais da razão de linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup>/linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>. As letras **a**, **b**, **c** representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos NI, ACT e CUR, respectivamente.





### 5.1- Aspectos imunofenotípicos associados à infecção por *L. (L.) chagasi*

Vários estudos têm sugerido que as diferentes manifestações clínicas da LV podem estar associadas ao distinto e complexo processo de interação parasito-hospedeiro envolvendo o sistema imune. Os indivíduos infectados por *L. (L.) chagasi* podem apresentar diferentes formas clínicas que refletem o grau de morbidade associado à infecção. Acredita-se que essas formas distintas são conseqüências de mecanismos multifatoriais que envolvem tanto aspectos do parasito quanto do hospedeiro vertebrado. Dentre os fatores relacionados ao hospedeiro vertebrado destacam-se o perfil da resposta imune. Durante a infecção por *L. (L.) chagasi*, o sistema imune fica exposto a uma mistura complexa de antígenos derivados do parasito, respondendo a esses estímulos com mecanismos múltiplos da resposta imune celular e humoral. Vários estudos buscam correlacionar fatores ligados aos mecanismos imunopatológicos/protetores com o desenvolvimento/manutenção das diferentes formas clínicas da LV. A natureza desses fatores bem como os mecanismos pelos quais eles se manifestam ainda estão por ser esclarecidos.

É importante considerar que a resposta imune representa um somatório de interações entre moléculas sinalizadoras sob a forma de fatores solúveis, receptores de superfície celular, imunoglobulinas e citocinas. Assim o direcionamento da resposta do hospedeiro humano infectado por *L. (L.) chagasi* a antígenos derivados do parasito não deve ser avaliada de forma restrita aos aspectos imunofenotípicos da membrana celular, devendo ser ampliado para uma discussão mais funcional envolvendo outros aspectos da resposta imune. Nesse contexto, será apresentada a seguir, uma análise descritivo-analítica das principais alterações no perfil imunofenotípico observadas em indivíduos infectados com *L. (L.) chagasi* subsidiada por investigações complementares acerca de outros aspectos da imunidade na LV previamente descritos por outros autores. Para tanto, trabalharemos no âmbito das diferentes manifestações clínicas da LV com duas abordagens, considerando as formas clínicas: clássica e assintomática. Em cada abordagem serão apresentadas duas hipóteses: uma referente aos elementos celulares da imunidade inata e outra para a imunidade adaptativa.

A análise conjunta dos dados de avaliação do perfil imunofenotípico presente em indivíduos infectados com *L. (L.) chagasi*, portadores de LV clássica, revelou deficiências em parâmetros fenotípicos de células da imunidade inata importantes

---

para a instalação do processo infeccioso por *L. (L.) chagasi* (Figura 47). Podemos, então, considerar a seguinte hipótese: **“O micro ambiente criado pelo parasito, tanto nos sítios viscerais quanto na medula óssea estaria favorecendo a modulação da expressão de moléculas fundamentais para a ontogenia, ativação e migração de células da imunidade inata, contribuindo para os eventos iniciais de estabelecimento da infecção.”**

As alterações na resposta inata poderiam promover o direcionamento da resposta imune adaptativa para um perfil também favorável à disseminação da infecção e ao estabelecimento dos aspectos clínicos e imunopatológicos associados à forma clássica da LV. Nesse contexto, várias alterações no fenótipo dos PMN (neutrófilos e eosinófilos) foram observadas. Considerando que os PMN são as primeiras células que migram para os tecidos em resposta aos patógenos invasores e conseqüentemente as primeiras células a entrarem em contato com o patógeno, torna-se fundamental a compreensão do papel dessas células na infecção por *Leishmania*. Os PMN estão envolvidos na internalização e destruição de *Leishmania*, via produção de reativos do oxigênio e nitrogênio, liberação de enzimas líticas estocadas em grânulos citoplasmáticos além de exercer funções reguladoras, por secretarem citocinas. O papel dessas células nos passos iniciais da infecção por *Leishmania* em humanos é em grande parte desconhecido, e há limitadas informações sobre a resposta de PMN à *Leishmania*, particularmente sobre a expressão de moléculas associadas à apresentação de antígeno e co-estimulação. PMN em doenças inflamatórias crônicas e na presença de IFN- $\gamma$  podem ser ativados por síntese “de novo” e expressar MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras como CD80/CD86, todas requeridas para a apresentação de antígenos a linfócitos T. A diferenciação em células com propriedades características de células dendríticas ligam os PMN a respostas imunes específicas, ou seja, representam uma conexão entre a imunidade inata e adaptativa (HÄNSCH & WAGNER. 2003). Parece que a fagocitose via interação de imunocomplexos com CD32, CD16 e CD23, favorece o processamento e apresentação de antígenos associados ao MHC de classe II e subseqüentemente a ativação de resposta adaptativa, num momento muito inicial da infecção. Nós observamos que durante a infecção ativa, ocorre redução do número e do percentual de PMN expressando HLA-DR e a molécula co-estimuladora CD86, o que poderia estar associado ao direcionamento da resposta imune para um perfil favorável ao estabelecimento da infecção, mediado pela deficiência de ativação desses fagócitos. No entanto, a freqüência de neutrófilos

expressando CD23 está aumentada em valores absolutos e percentuais nesses indivíduos. Essa habilidade dos neutrófilos em interagir com o compartimento humoral via Fc-εRII poderia não resultar em mecanismos protetores, estando limitada pela reduzida capacidade dessas células em produzir IFN-γ (PERUHYPE-MAGALHÃES et al. 2005). Por outro lado, nossos dados demonstram uma reduzida freqüência de eosinófilos expressando CD23 em valores absolutos e percentuais em indivíduos com a doença ativa sugerindo a ineficácia da interação celular-humoral nesse compartimento celular.

Nós observamos também que indivíduos portadores de LV clássica apresentam uma baixa freqüência de PMN expressando CD28. Tem sido descrito que a interação de CD28 expresso em neutrófilos com CD80/CD86 em macrófagos infectados, induziria a produção de IFN-γ por neutrófilos, o que poderia favorecer a ativação de uma resposta direcionada ao controle da infecção (VENUPRASAD et al. 2002). Em eosinófilos, WOERLY et al. (1999), descrevem que a produção de citocinas como IL-2 e IFN-γ depende da presença de mecanismos co-estimuladores, interação CD28 e co-receptores, sugerindo que os eosinófilos exerçam função reguladora da resposta imune. PERUHYPE-MAGALHÃES et al. (2005), demonstram que indivíduos portadores de LV clássica apresentam elevada freqüência de PMN produtores de IL-4 e IL-10, associada à diminuição na expressão de IFN-γ. Assim, podemos sugerir que na doença ativa, PMN apresentando alterações fenotípicas que favorecem o estabelecimento e manutenção inicial da infecção, sejam importantes, especialmente a nível compartimentalizado.

Em conjunto, esses dados reforçam nossa idéia de que a incapacidade de PMN exercerem seu papel leishmanicida poderia ser fundamental para o estabelecimento da infecção. Nesse contexto, tem sido proposto que após a fagocitose da *Leishmania*, os neutrófilos permaneceriam viáveis por um período de aproximadamente 72 horas, até a chegada dos macrófagos no foco infeccioso. Nesse caso, o neutrófilo funcionaria como reservatório inicial para o parasito (AGA et al. 2002). Os autores sugerem que o neutrófilo promove um nicho de sobrevivência inicial para a *Leishmania*. Com a chegada dos macrófagos ao foco inflamatório, ocorre interação destas células com os neutrófilos que tardiamente entram em apoptose. Estes seriam, então, fagocitados, sem ativar mecanismos microbicidas, o que poderia ser uma das formas de entrada silenciosa do parasito na célula alvo.

Outra observação de grande relevância e que dá suporte à nossa hipótese, trata-se dos dados de avaliação da população de monócitos, células alvo da

*Leishmania*. Sabe-se que dentro destas, o parasito possui várias estratégias para evadir do sistema imune. Uma delas é a modulação ou a não indução da expressão de moléculas envolvidas direta ou indiretamente na apresentação de antígenos. Tem sido descrito que na infecção por *L. (L.) donovani* ocorre uma menor expressão de moléculas de MHC de classe I e II (REINER et al. 1994; BUATES & MATLASHEWSKI. 2001). Observamos que na doença progressiva, o parasito desenvolve estratégias que favorecem seu estabelecimento e manutenção no hospedeiro, uma vez que indivíduos portadores de LV clássica apresentaram um menor número de monócitos pró-inflamatórios, fonte importante de TNF- $\alpha$  (FRANKENBERGER et al. 1996), menor número de monócitos ativados e capazes de induzir ativação eficaz de resposta linfocitária, além de um menor número de monócitos CD23<sup>+</sup>. A expressão de CD23 vem sendo associada ao aumento de produção de NO e controle de infecção por patógenos endógenos, dentre eles a *Leishmania*. Tem sido descrito que na infecção por cepas associadas ao comprometimento visceral, ocorre uma modulação da expressão de CD23 em monócitos, associada a níveis elevados de IL-4 e IL-10 (VOULDOUKIS et al. 1997). As alterações fenotípicas observadas em monócitos vão de encontro aos dados de PERUHYPE-MAGALHÃES et al. (2005), que descrevem que na forma clássica da LV, ocorre um importante comprometimento funcional de monócitos, caracterizado por uma baixa expressão de TNF- $\alpha$  e IL-12 em associação a uma elevada expressão de IL-10 por estas células. Como sugerido por ALMEIDA et al. (2003), a reduzida expressão de moléculas de ativação e a ausência e/ou diminuição da produção de importantes citocinas pró-inflamatórias induzidas pela *L. (L.) chagasi* poderia levar o sistema imune, pelo menos nas fases iniciais, a um estado de anergia ou ignorância.

É importante considerarmos ainda, no âmbito da imunidade inata, o papel das células NK que são consideradas células citotóxicas não restritas ao MHC e produtoras de citocinas do tipo 1 e 2 (JANEWAY, C. A, TRAVES, P, WALPORT, M, SHLOMCHIK, M. 2002). No entanto, estas células são importante fonte de IFN- $\gamma$  durante os eventos iniciais de processos infecciosos e favorece a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> para um perfil tipo 1 (KEMP et al. 1996). Nós demonstramos que durante a infecção ativa ocorre diminuição no número e no percentual de células NK circulantes. Parece que na infecção ativa ocorre um prejuízo funcional de células NK (NYLEN et al. 2003). MANNA et al. (1994), mostraram que vários constituintes presentes no plasma de indivíduos portadores de LV clássica suprimem a atividade

lítica das células NK. Os autores sugerem que este efeito se deve principalmente aos elevados níveis de imunoglobulinas, fator reumatóide e triglicerídeos na doença ativa. Consistente com estes dados, PERUHYPE-MAGALHÃES et al. (2005), descrevem a presença de elevada frequência de células NK expressando IL-4, em indivíduos portadores de LV clássica, sugerindo um papel modulador da infecção para estas células, o que favoreceria, assim, o direcionamento da resposta imune para um perfil associado à progressão da doença. Nesse contexto, podemos sugerir que estas células poderiam estar migrando para focos teciduais acometidos pelo parasitismo e participando de mecanismos associados ao estabelecimento da infecção.

Em infecções crônicas humanas, a resposta imune específica mediada por células da imunidade adaptativa parece ser de vital importância para o estabelecimento de mecanismos persistentes e duradouros de imunoproteção. Dessa forma, uma resposta inapropriada pode não apenas resultar em falta de proteção, como até contribuir para a patogenia da doença. Portanto, a *Leishmania* seria um parasito relativamente inofensivo se o organismo hospedeiro fosse apto a elaborar uma resposta imune adaptativa apropriada capaz, de controlar a infecção. No âmbito da imunidade adaptativa, a resposta mediada por células T, quando inadequada, poderia causar uma doença grave (KEMP et al. 1996). A análise dos dados referentes ao perfil imunofenotípico do compartimento adaptativo de indivíduos portadores de LV clássica revelou alterações importantes que permitiram a elaboração da seguinte hipótese: ***“o micro ambiente criado pelo parasito e por células da imunidade inata, estaria favorecendo a modulação da expressão de moléculas fundamentais para a ativação e função de linfócitos.”***

As alterações na resposta adaptativa poderiam contribuir para a manutenção do perfil da resposta imune favorável à disseminação da infecção e ao estabelecimento dos aspectos clínicos e imunopatológicos associados à forma clássica da LV. Nesse contexto, observamos diminuição significativa no número e no percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados, bem como na expressão de moléculas co-estimuladoras por estas células, sugerindo uma possível perda de cooperação mediada por linfócitos T auxiliares. Nesse micro ambiente, observa-se efetiva ativação de linfócitos T citotóxicos. A queda no número de linfócitos B ativados circulantes, associada com a elevação na frequência de expressão da molécula co-estimuladora CD86 por linfócitos B, sugere uma dinâmica de eventos de ativação onde os linfócitos B ativados, secretores de imunoglobulinas, encontram-se

compartimentalizados na medula óssea, no baço e nos linfonodos. Estudos histopatológicos reforçam essa hipótese demonstrando acúmulo de células plasmocitoides em órgãos linfóides (VERONESI R. & FOCACCIA R. 2004).

Nossos dados de avaliação de resposta mediada por linfócitos T, demonstram a presença de um elevado número e percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados (HLA-DR<sup>+</sup>) em associação a uma baixa freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, dados esses também observados nas análises em percentual e confirmados pela menor razão entre linfócitos T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (Fig. 27). Estudos avaliando a freqüência e o padrão de produção de citocinas por clones de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> estimulados com LSA, demonstraram que indivíduos com LV clássica apresentavam um aumento na freqüência de células T ativadas, onde 90 a 100% das células tinham fenótipo CD8<sup>+</sup> e seriam as células responsáveis pelo aumento da IL-10 observado nesta forma clínica da LV (CENINI et al. 1993; HOLADAY et al. 1993a e 2000). Também PERUHYPE-MAGALHÃES et al. (2005), descrevem a presença de elevada freqüência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando IL-10 nesses indivíduos. Esses achados dão suporte à hipótese de serem estes linfócitos de grande importância na progressão da doença. A relevância desta subpopulação celular na LV clássica pode também ser confirmada pela análise do balanço entre monócitos pró-inflamatórios / linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (Fig. 24). Esses dados demonstram claramente o predomínio da imunidade celular adaptativa mediada por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, na imunopatologia da LV.

Dado importante observado em nossos estudos, trata-se do menor número e percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando a molécula co-estimuladora CD28. A instalação de uma resposta imune apropriada depende de uma cuidadosa regulação da ativação de linfócitos. Para este fim, linfócitos requerem dois sinais independentes para se tornarem completamente ativados. O primeiro, um sinal antígeno-específico é enviado via receptor antigênico único: TCR em células T ou Ig na superfície de células B. O segundo sinal, denominado coestimulador via CD28, é independente do receptor antigênico e é crítico para permitir a completa ativação, sustentar a proliferação celular, evitar anergia e/ou apoptose e induzir diferenciação para células efetoras e de memória. CD28 também otimiza a resposta de células T ativadas, promovendo produção de IL-2 e conseqüente, sobrevivência das células (FRAUWIRTH & THOMPSON. 2002; SHARPE & FREEMAN. 2002). Logo, podemos sugerir que na LV clássica, a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> encontra-se deficiente dado o reduzido número de células CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> provavelmente por perda de

mecanismos co-estimuladores. Uma modulação da resposta imune auxiliar poderia levar à perda de conexões importante e o favorecimento do parasitismo pela desativação de células com papel funcional crucial para o controle da infecção.

Ainda, no contexto de células auxiliares, em associação aos dados apresentados acima, em nosso estudo observamos que indivíduos portadores de LV clássica apresentam uma baixa frequência de células T reguladoras ( $CD4^+CD25^{high}$ ) circulantes. Estas células constituem cerca de 5 a 15% da população de linfócitos T  $CD4^+$  periféricos de roedores e humanos em condições normais, além de possuírem um potente efeito na atividade de ambos os linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  (BELKAID Y. 2003). Células T  $CD4^+CD25^{high}$  endógenas são funcionalmente caracterizadas como células importantes no controle da resposta imune excessiva ou mal direcionada contra patógenos e antígenos próprios. Segundo BACHER-ALLAN et al. (2001), as células  $CD4^+CD25^{high}$  apresentam um papel regulador, caracterizado por diminuição da produção de citocinas, em especial a produção de  $IFN-\gamma$ , e habilidade de inibir proliferação celular *in vitro*. VITELLI-AVELAR et al. (2005), sugerem que essa subpopulação celular possa estar relacionada ao controle da atividade citotóxica de células T através da inibição da ativação exagerada de linfócitos T  $CD8^+HLA-DR^+$ , no modelo de infecção humana por *T. cruzi*. Tal idéia vem corroborar com o aumento visto no número de linfócitos T  $CD8^+HLA-DR^+$  nos indivíduos portadores da LV clássica. Na leishmaniose experimental, parece que as células T reguladoras controlam a resposta tipo 2 excessiva em camundongos suscetíveis assim como regulam a resposta tipo 1 excessiva presente em camundongos resistentes (BELKAID Y. 2003). Acreditamos que no contexto da infecção humana ativa, a diminuição no número de células T reguladoras seria um evento importante no direcionamento da resposta imune para um perfil associado à progressão da infecção, uma vez que poderia ocorrer um predomínio de células responsáveis pela manutenção de uma resposta imune tipo 2 no micro ambiente da infecção.

Sabe-se que a LV clássica é caracterizada por uma intensa ativação policlonal de linfócitos B, seguida de produção exacerbada de imunoglobulinas, levando ao quadro de hipergamaglobulinemia e indução de formação de imunocomplexos (GALVÃO-CASTRO et al. 1984). Nossos dados revelaram uma diminuição no número de linfócitos B convencionais ( $CD19^+CD5^-$ ) e de linfócitos B ativados ( $CD19^+CD23^+$ ) no sangue periférico de portadores de LV clássica paralelo ao aumento na frequência de expressão de CD86 por essas células. A expressão de CD23 por linfócito B, tem sido relacionada ao processo de ligação e internalização



de imunocomplexos, favorecendo o processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T. Os linfócitos B expressando CD23, seqüestrados para órgãos linfóides poderiam estar envolvidos não só na cooperação com linfócitos T como também na produção de anticorpos antígeno-específicos em indivíduos apresentando infecção ativa. No entanto, estes anticorpos parecem não exercer papel protetor durante a infecção. Assim, as alterações fenotípicas em linfócitos B sugerem uma desregulação funcional dessa população celular no controle da infecção. A elevada expressão de CD86, por células B no contexto da apresentação de antígenos, poderia direcionar a produção de citocinas para um perfil que favorecesse a disseminação da infecção. Tem sido descrito que a elevada expressão de CD86 por outras células apresentadoras de antígeno na leishmaniose, como por exemplo, os monócitos, estariam associados à produção de IL-4 e IL-10 e inibição na produção de IFN- $\gamma$  (BROWN et al. 1996; BRODSKY et al. 2001). Mecanismo semelhante poderia estar presente nos eventos de apresentação de antígeno via linfócitos B. Esta hipótese é consistente com os dados de PERUHYE-MAGALHÃES et al. (2005), que demonstraram uma elevada expressão de IL-4 por linfócitos B em indivíduos portadores de LV clássica. É interessante destacarmos ainda, que embora nossas análises do número de linfócitos B1 (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) circulantes não tenham apresentado diferenças significativas, nós observamos que o percentual de linfócitos B1 encontra-se aumentado em portadores de LV clássica. Esta subpopulação celular corresponde a um subconjunto significativo de células B (cerca de 5%) em camundongos e em humanos e possui um repertório de receptores (CD5, IgM) e propriedades funcionais característicos. Sua localização sugere participação em funções iniciais, não-adaptativa, da resposta imune (JANEWAY, C. A, TRAVES, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. 2002). A presença de linfócitos B1 vem sendo consistentemente associada à LV clássica, onde se observa produção de auto-anticorpos e elevada capacidade de expressar grandes quantidades de IL-10 (LOUZIR et al. 1994; ISHIDA et al. 1992). Neste contexto, podemos considerar, que estas células também estariam participando de eventos necessários à progressão da doença.

Numa segunda abordagem, a análise conjunta dos dados de avaliação do perfil imunofenotípico de células da imunidade inata presente em indivíduos infectados com *L. (L.) chagasi* portadores de infecção assintomática revelou um perfil de resposta imune preservada, ou seja, observa-se que portadores de LV assintomática apresentam um padrão fenotípico semelhante ao observado em

---

indivíduos não infectados (Fig. 47). Nesse contexto, podemos considerar a seguinte hipótese: **“Na infecção assintomática, os eventos fenotípicos caracterizam uma reduzida manifestação sistêmica no contexto da imunidade inata. O estabelecimento de um micro ambiente favorável à contenção eficaz da disseminação do parasito e controle do estabelecimento da infecção provavelmente representaria um evento compartimentalizado.”**

Observamos que nos indivíduos portadores de LV assintomática o número de PMN e monócitos circulantes ativados e expressando moléculas co-estimuladoras, está preservado. Esses dados indicam que indivíduos portadores de infecção assintomática apresentam um padrão fenotípico semelhante ao observado em indivíduos não infectados, embora tenhamos observado reduzida freqüência de monócitos pró-inflamatórios e um elevado percentual de PMN expressando HLA-DR e CD86 nestes indivíduos. Em outros modelos de doenças infecciosas, como na Doença de Chagas, também se tem observado uma diminuição no número de monócitos pró-inflamatórios em portadores de doença assintomática/indeterminada (VITELLI et al. 2004). Considerando que os monócitos pró-inflamatórios são a principal fonte de TNF- $\alpha$ , nossos dados são consistentes com os achados de PERUHYPE-MAGALHÃES et al. (2005). Os autores descrevem que indivíduos portadores de LV assintomática apresentam uma redução no número de monócitos produtores de TNF- $\alpha$ . No entanto, é importante ressaltar que nossos achados em percentual, sugerem que as células da imunidade inata no contexto da infecção assintomática apresentam capacidade de favorecer o desenvolvimento de uma resposta adaptativa relevante ao controle da infecção em nível compartimentalizado. Consistente com essa hipótese de resposta compartimentalizada, PERUHYPE-MAGALHÃES et al. (2005) demonstraram que indivíduos assintomáticos apresentam no contexto *ex vivo* perfil de citocinas semelhante àquele observado em indivíduos não infectados. Por outro lado, esses autores mostraram que *in vitro* na presença de antígeno de *L. (L.) chagasi*, simulando a situação compartimentalizada, onde os leucócitos estariam num micro ambiente com presença de antígeno do parasito, observa-se uma elevada expressão tanto de IFN- $\gamma$  e IL-12, quanto de IL-4 e IL-10 por células da resposta imune inata. Acreditamos que a presença de um padrão de resposta imune inata celular balanceada poderia ser importante nos eventos imunológicos compartimentalizados na forma clínica assintomática da LV.

No âmbito da imunidade adaptativa, à semelhança da imunidade inata, observamos que na infecção assintomática, os indivíduos apresentam perfil de

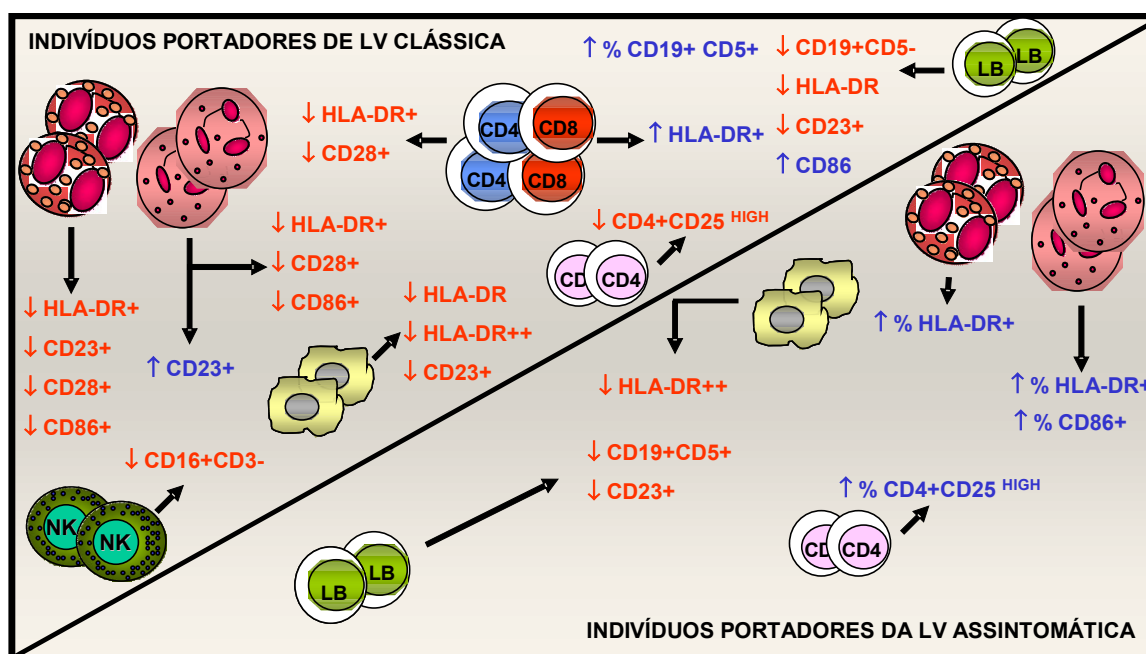
---

resposta imune preservada, com um padrão fenotípico semelhante ao observado em indivíduos não infectados (Fig. 47). Nesse contexto, mantemos a mesma hipótese de interpretação dos dados referentes ao compartimento da imunidade inata, ou seja: **“Na infecção assintomática, os eventos fenotípicos caracterizam ausência de manifestação sistêmica”**.

Nós observamos que a LV assintomática é caracterizada por um padrão de células T ativadas, bem como uma expressão de moléculas co-estimuladoras, semelhante ao observado em indivíduos não infectados. Além disso, estes indivíduos apresentam redução no número e percentual de linfócitos B ativados. Tem sido descrito que a forma clínica assintomática é caracterizada pela presença de elevada produção de IFN- $\gamma$ , sugerindo a importância de eventos da imunidade celular no controle da morbidade na LV (CARVALHO et al. 1992). Dessa forma, a ausência de sinais fenotípicos de ativação celular no compartimento da imunidade adaptativa, poderia parecer inconsistente. Entretanto, como mencionado anteriormente na interpretação dos dados da imunidade inata, acreditamos que na LV assintomática, a ausência de alterações fenotípicas no sangue periférico poderia ser traduzida como a existência de um padrão de resposta não sistêmica, no qual as células da imunidade adaptativa revelariam o seu perfil efetor apenas num micro ambiente com a presença do antígeno do parasito. Consistente com essa abordagem, novamente nos referimos ao trabalho de PERUHYPE-MAGALHÃES et al. (2005). Os autores demonstraram que a despeito de um perfil basal de citocinas observado no contexto *ex vivo* para células da imunidade inata de indivíduos assintomáticos, há participação efetiva tanto de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, quanto de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no perfil de produção de citocinas com a presença de células produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 em culturas estimuladas com antígeno de *L. (L.) chagasi*. Considerando os achados acima e nossas análises do balanço entre linfócitos T ativados e células T reguladoras (Fig 28), acreditamos na existência de um padrão de resposta imune celular balanceado nos eventos imunológicos compartimentalizados na forma clínica assintomática da LV.

De maneira interessante, nossos dados de avaliação de linfócitos B demonstram que a LV assintomática é caracterizada por uma baixa frequência de linfócitos B1 (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>). Esse achado vai de encontro com nossos dados de avaliação percentual de linfócitos B1, descritos acima e com dados da literatura que relatam que essa subpopulação de linfócitos B vem sendo associada à infecção ativa. Além disso, observamos que o número e o percentual de células B ativadas

também se encontra reduzido na infecção assintomática. Esse dado foi confirmado, através de análises da razão entre células da imunidade celular inata (monócitos pró-inflamatórios) e linfócitos B ativados, além da razão entre células da imunidade celular adaptativa (linfócitos T ativados) e linfócitos B ativados (Fig. 25 e 29, respectivamente). Nossos resultados, ao contrário do que observamos para os indivíduos portadores de LV clássica, sugerem uma pequena participação de linfócitos B na infecção assintomática, o que é compatível com a hipótese de ausência de manifestação sistêmica na infecção assintomática por *L. (L.) chagasi*.



**Figura 47:** Padrão de expressão de marcadores imunofenotípicos por leucócitos do sangue periférico de indivíduos portadores da LV clássica e indivíduos assintomáticos.

( = neutrófilos, = eosinófilos, = monócitos, = NK, = linfócitos T CD4<sup>+</sup>, = linfócitos T reguladores, = linfócitos T CD8<sup>+</sup> e = linfócitos B). As cores destacadas em **vermelho** e **azul** representam um menor ou maior número de células expressando os marcadores fenotípicos, respectivamente.

## 5.2- Aspectos imunofenotípicos associados ao efeito da terapêutica específica na LV clássica

Os estudos que avaliam indivíduos antes e após o tratamento da LV clássica descrevem que a cura está associada com o desaparecimento de sinais e sintomas clínicos, normalização da reposição celular no sangue periférico e normalização da produção de mediadores imunológicos envolvidos no controle da infecção.

Iremos apresentar a seguir, uma análise crítica das principais alterações observadas no estudo dos aspectos imunofenotípicos de células do sangue periférico de indivíduos curados da LV clássica após terapêutica etiológica.

Como demonstrado na figura 48, a análise conjunta dos dados, revelou que a terapêutica etiológica, exerce um efeito modulador no padrão imunofenotípico de indivíduos portadores de LV clássica. Observa-se um restabelecimento do estado de ativação e co-estimulação basal de células da imunidade inata em indivíduos curados. Nesse contexto, podemos considerar a seguinte hipótese: ***“o tratamento etiológico, eficaz na redução da carga parasitária, estaria favorecendo um micro ambiente propício para o controle da infecção, uma vez que ocorre recuperação da capacidade respondedora de PMN, monócitos e células NK num momento inicial e crucial para o processo infeccioso.”***

Os dados demonstram que com a cura, ocorre um restabelecimento da resposta imune inata. Este se justifica devido à presença, no sangue periférico, de PMN ativado e expressando moléculas co-estimuladoras numa frequência semelhante à observada em indivíduos não infectados. Entretanto, semelhante ao que revelaram as análises fenotípicas em indivíduos portadores de LV clássica, observamos que a frequência de neutrófilos expressando CD23 mantém-se aumentada após a cura, embora este achado não foi observado nas análises em valores percentuais. DUGAS et al. (1995) e VOULDOUKIS et al. (1994) sugerem que o aumento da expressão de CD23 possa estar associado ao efeito da IL-4. Os autores acreditam que em monócitos, o aumento de IL-4 em associação ao IFN- $\gamma$ , poderia favorecer a expressão de CD23 e o aumento na produção de NO, mediador imunológico fundamental na destruição de *Leishmania*. Efeito semelhante pode estar ocorrendo em neutrófilos, uma vez que PERUHYPE-MAGALHÃES et al. (2005) descreveram que indivíduos curados apresentam altos níveis de neutrófilos produtores de IL-4 e IFN- $\gamma$ . Assim, podemos sugerir que o elevado número de

---

neutrófilos expressando CD23 em associação ao IFN- $\gamma$  seria de grande relevância para o controle inicial do processo infeccioso nestes indivíduos.

Observamos ainda que indivíduos curados apresentam menor número de monócitos ativados, associado a um restabelecimento, para níveis basais, no número e percentual de monócitos pró-inflamatórios. Acreditamos que o tratamento, favorece a princípio a recuperação da capacidade funcional dos monócitos em destruir a *Leishmania*.

É importante destacarmos ainda que o tratamento favorece também a recuperação do número e percentual de células NK circulantes. Considerando que as células NK representam uma importante fonte de IFN- $\gamma$ , estas seriam relevantes na resistência inicial à infecção.

Baseado no exposto acima, acreditamos que as células da imunidade inata exerçam papel importante na resistência do indivíduo curado após tratamento etiológico eficaz.

Como também demonstrado na figura 48, a análise conjunta dos dados, revelou um impacto diferencial da terapêutica etiológica sobre as subpopulações de células da imunidade adaptativa. No processo de cura, a imunidade celular adaptativa torna-se fundamental para o estabelecimento de uma resposta eficaz no controle da infecção por *Leishmania* e a imunidade protetora é geralmente atribuída à presença de células T produtoras de IFN- $\gamma$  (HAILU et al. 2005). Nesse contexto, podemos considerar a seguinte hipótese: **“o tratamento etiológico, em associação ao micro ambiente de citocinas montado por células da imunidade inata, estaria favorecendo o estabelecimento de uma resposta celular adaptativa efetiva no controle da infecção, e no desenvolvimento de mecanismos protetores contra a re-infecção.”**

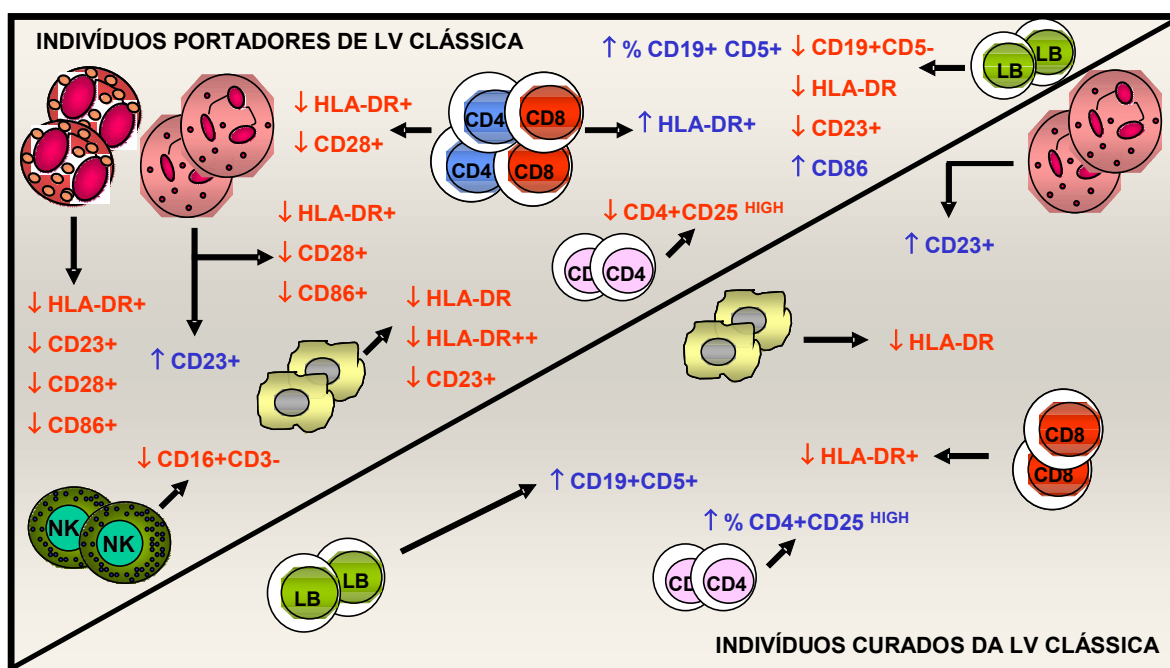
Indivíduos curados da LV clássica apresentam um padrão imunofenotípico caracterizado por um restabelecimento basal do estado de ativação e co-estimulação de células T CD4<sup>+</sup>. Estes achados são muito importantes, considerando que a resposta celular mediada por linfócitos T auxiliares é fundamental para a conexão celular e o desenvolvimento de imunidade protetora contra o patógeno. Tem sido descrito que após a cura, ocorra restauração da resposta linfoproliferativa e produção de IL-12, IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em culturas de PBMC estimuladas com LSA (HOLADAY et al. 1993a; CILLARI et al. 1995; BACELLAR et al. 2000). Além disso, tem sido demonstrado que o perfil celular também muda com a cura e 70% dos linfócitos T apresentam fenótipo CD4<sup>+</sup> (HOLADAY et al. 1993a).

Nossos dados demonstram ainda que o tratamento etiológico promove uma redução significativa na frequência em valores absolutos e percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados. Embora presentes em níveis basais em indivíduos curados, acreditamos que o estabelecimento de eventos de memória imunológica estão intrinsecamente contidos no âmbito da imunidade mediada por células T CD8<sup>+</sup> que passariam a exercer um papel importante na função efetora anti-*Leishmania*, num eventual contato posterior com antígenos do parasito. Consistente com essa hipótese, PERUHYPE-MAGALHÃES et al. (2005), demonstraram que, *in vitro*, na presença de antígenos de *L. (L.) chagasi*, células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos curados apresentam elevada expressão de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5. Eles sugerem que as células T CD8<sup>+</sup> contribuiriam para ativação de mecanismos protetores contra o parasito. É interessante destacar que esta resposta mediada por células citotóxicas seria regulada, uma vez que nossos dados de avaliação da razão entre linfócitos T ativados e células T reguladoras demonstram a participação de células reguladoras no controle da ativação exagerada da imunidade celular adaptativa (Figura 45). Este perfil fenotípico sugere então a restauração de um ambiente capaz de favorecer o estabelecimento de mecanismos protetores salientando a importância dos eventos imunomoduladores no âmbito da imunidade celular controlada, não deletéria.

Quanto à imunidade humoral, observamos uma restauração no número e no percentual de células B convencionais e linfócitos B ativados, a níveis basais, após tratamento etiológico. Estas células, por serem células apresentadoras de antígeno, podem exercer um impacto relevante no desenvolvimento e função de células T, podendo influenciar o direcionamento da resposta imune para um padrão predominantemente do tipo 1, sugerindo a participação também de linfócitos B no desenvolvimento de uma imunidade protetora contra o parasito. Esta idéia é consistente com os dados de PERUHYPE-MAGALHÃES et al. (2005). Os autores observaram a presença de uma elevada expressão de TNF- $\alpha$  e IL-4 por linfócitos B, em indivíduos curados e sugerem que esta população celular seja importante tanto na progressão quanto no controle e desenvolvimento de mecanismos protetores à infecção.

Por outro lado, nossos dados demonstram que mesmo após a cura, há um predomínio no número de linfócitos B1 (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) circulantes, embora nossas análises em valor percentual não tenham demonstrado aumento significativo de linfócitos B1 nestes indivíduos. Ainda não se conhece a existência de uma correlação dessas células com o controle da LV. No modelo de infecção por *S.*

*mansoni*, tem sido descrita uma elevada presença de linfócitos B1 no sangue periférico de indivíduos após 6 meses de cura (CORREA-OLIVEIRA et al. 2000). Também tem sido descrito que células B1 estão presentes no sangue periférico de indivíduos recentemente tratados da LV clássica (LOUZIR et al. 1994). Provavelmente a existência da interligação baço/sangue, possa explicar a persistência dessa população celular no sangue periférico de indivíduos curados, considerando que o baço, órgão altamente comprometido durante a LV clássica, representa um dos principais sítios de residência dos linfócitos B1 (MARTINS-FILHO et al. 1998; TEIXEIRA-CARVALHO et al. 2002, 2003). Além disso, esses dados podem refletir alterações permanentes no compartimento esplênico de indivíduos infectados por *L. (L.) chagasi*.



**Figura 48:** Padrão de expressão de marcadores imunofenotípicos por leucócitos do sangue periférico de indivíduos portadores da LV clássica e indivíduos curados.

( = neutrófilos, = eosinófilos, = monócitos, = NK, = linfócitos T CD4<sup>+</sup>, = linfócitos T CD8<sup>+</sup> e = linfócitos B). As cores destacadas em **vermelho** e **azul** representam um menor ou maior número de células expressando os marcadores fenotípicos, respectivamente.





1. A análise do compartimento da imunidade inata do sangue periférico revela padrões fenotípicos distintos em indivíduos portadores de LV clássica e assintomática.

*Comentários:*

*- Indivíduos portadores de LV clássica apresentam deficiências em parâmetros fenotípicos de células da imunidade inata importantes para o controle inicial do processo infeccioso por L. (L.) chagasi. Observa-se uma diminuição no número de células ativadas com redução da expressão de moléculas co-estimuladoras. Essas alterações são consistentes com o desenvolvimento de um micro ambiente favorável ao crescimento do parasito e estabelecimento do processo infeccioso.*

*- A caracterização dos aspectos fenotípicos da imunidade inata nos indivíduos portadores de LV assintomática, sugere a presença de um perfil de resposta imune preservada. Observa-se um padrão fenotípico semelhante ao observado em indivíduos não infectados e uma diminuição no número de monócitos pró-inflamatórios. Este perfil fenotípico sugere ausência de manifestação sistêmica no contexto da imunidade inata. O estabelecimento de um micro ambiente favorável à contenção eficaz da disseminação do parasito e controle do estabelecimento da infecção parece representar um evento compartimentalizado.*

2. No âmbito da resposta imune adaptativa, indivíduos portadores de LV clássica apresentam uma dicotomia dos eventos de ativação celular enquanto indivíduos assintomáticos demonstram um perfil fenotípico basal e balanceado.

*Comentários:*

*- Indivíduos portadores de LV clássica apresentam um comprometimento do perfil fenotípico da imunidade celular caracterizado por uma elevada frequência de células T CD8<sup>+</sup> ativadas, baixa frequência de células T reguladoras e na ausência de sinais fenotípicos de ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o que é consistente com a reduzida frequência de células T expressando moléculas co-estimuladoras. Observa-se ainda uma redução do número de células B ativadas, com elevação na frequência de linfócitos CD19<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>. Essas alterações fenotípicas sugerem a contribuição de imunidade celular citotóxica e da imunidade humoral no estabelecimento e manutenção da infecção clássica por L. (L.) chagasi.*

*- Indivíduos assintomáticos apresentam um padrão fenotípico preservado. Essa forma clínica é caracterizada por um padrão de células T ativadas, bem como uma*

*expressão de moléculas co-estimuladoras, semelhante ao observado em indivíduos não infectados. Além disso, observa-se uma redução nos níveis de linfócitos B1 e linfócitos B ativados em portadores da infecção assintomática. A preservação de sinais fenotípicos de ativação celular em linfócitos T em associação à redução na participação de linfócitos B, responsáveis pelos elevados níveis de anticorpos que são descritos na infecção clássica, é compatível com a hipótese de ausência de manifestação sistêmica na infecção assintomática por L. (L.) chagasi.*

3. O balanço dos principais aspectos fenotípicos da imunidade inata e adaptativa, sugere que na LV clássica ocorre deficiência em eventos protetores da imunidade celular inata e o predomínio de eventos citotóxicos, enquanto na LV assintomática destacam-se os aspectos fenotípicos da resposta celular inata e adaptativa em detrimento da imunidade humoral, associados à regulação da resposta imune.

*Comentários:*

*- Indivíduos portadores de LV clássica apresentam uma menor razão entre monócitos HLA-DR<sup>++</sup>/linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, que podem ser considerados fundamentais para o estabelecimento da doença em indivíduos infectados por L. (L.) chagasi.*

*- Indivíduos portadores de LV assintomática apresentam um predomínio da razão entre monócitos HLA-DR<sup>++</sup>/linfócitos B CD23<sup>+</sup> e linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup>/linfócitos B CD23<sup>+</sup>. Além disso, destaca-se uma reduzida razão entre monócitos HLA-DR<sup>++</sup>/linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> e linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup>/linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>. Esses achados dão suporte à hipótese de que embora não existam sinais evidentes de alterações sistêmicas no padrão fenotípico de leucócitos circulantes em indivíduos assintomáticos, a presença de um padrão de resposta imune celular balanceado poderia ser importante nos eventos imunológicos compartimentalizados na forma clínica assintomática da LV.*

4. O tratamento etiológico eficaz apresenta um impacto positivo, restaurando o padrão fenotípico de células da imunidade inata para níveis basais observados em indivíduos não infectados.

*Comentário:*

*- Indivíduos curados apresentam um restabelecimento do número de PMN, monócitos e células NK circulantes e do estado de ativação e co-estimulação de PMN. Observa-se também um menor número de monócitos ativados em associação*

---

à restauração no número de monócitos pró-inflamatórios. Este perfil fenotípico sugere a restauração de um ambiente capaz de favorecer o estabelecimento de mecanismos protetores importantes para o controle da infecção causada por *L. (L.) chagasi*.

5. No âmbito da imunidade adaptativa, observa-se um impacto diferencial da terapêutica específica eficaz sobre as subpopulações de linfócitos T e B.

*Comentário:*

*Indivíduos curados apresentam uma redução na frequência de células T citotóxicas paralelo à restauração dos níveis basais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados e células TCD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> observados em indivíduos não infectados. Salienta-se a persistência de um elevado número de linfócitos B1 circulantes a despeito de valores basais de células B convencionais e linfócitos B ativados. Esses dados são relevantes, pois sugerem o restabelecimento de um ambiente de imunidade celular consistente com o desenvolvimento de uma imunidade protetora contra o parasito, salientando os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, como importante elo para a imunidade celular citotóxica, controlada, não deletéria. Acredita-se que a persistência de elevada frequência de linfócitos B1 no sangue periférico de indivíduos curados, possa refletir alterações permanentes no compartimento esplênico de indivíduos infectados por *L. (L.) chagasi*.*

6. O tratamento etiológico eficaz é acompanhado pela restauração de mecanismos imunorreguladores do sistema imunológico.

*Comentário:*

*- Indivíduos curados apresentam uma menor razão entre monócitos HLA-DR<sup>++</sup> /linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> e linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup> /linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>, sugerindo a recuperação da habilidade reguladora do sistema imunológico após tratamento da LV clássica. Este perfil fenotípico sugere a restauração de um ambiente capaz de favorecer o estabelecimento de mecanismos protetores salientando a importância dos eventos imunomoduladores no âmbito da imunidade celular controlada, não deletéria.*



*As alterações fenotípicas em células da imunidade inata e adaptativa no contexto ex vivo, sugerem a existência de marcadores imunológicos que poderiam ser empregados na caracterização das diferentes formas clínicas da LV bem como na caracterização do perfil imunológico associado à cura pós-terapêutica da LV.*

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGA E, KATSCHINSKI DM, ZANDBERGEN GV, LAUFS H, HANSEN B, MULLER K, SOLBACH W, LASKAY T. **Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major***. J Immunol 2002; 169: 898-905.
- ANDRADE ZA, REED SG, ROTERS SB, SADIGURSKY M. **Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis**. Am J Pathol 1984; 114:137-148.
- BACELLAR O, D'OLIVEIRA JR A, JERÔNIMO S, CARVALHO EM. **IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis**. Cytokine 2000; 12: 1228-1231.
- BAECHER-ALLAN C, BROWN JA, FREEMAN GJ, HAFNER DA. **CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood**. J Immunol. 2001;167(3):1245-53.
- BADARÓ R, JONES TC, LORENÇO R, CERF BJ, SAMPAIO D, CARVALHO EM, ROCHA H, TEIXEIRA R, JOHNSON WD Jr. **A prospective study of Visceral Leishmaniasis in an endemic area of Brazil**. J Infect Dis 1986; 154: 639-649 a.
- BADARÓ R, JONES TC, CARVALHO EM, SAMPAIO D, REED SG, BARRAL A, TEIXEIRA R, JOHNSON WD Jr. **New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis**. J Infect Dis 1986; 166: 1124-1132 b.
- BEIL WJ, MEINARDUS-HAGER G, NEUGEBAUER DC, SORG C. **Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice**. J Leukoc Biol 1992; 52: 135-142.
- BELGE KU, DAYYANI F, HORELT A, SIEDLAR M, FRANKENBERGER M, FRANKENBERGER B, ESPEVIK T, ZIEGLER-HEITBROCK L. **The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF**. J Immunol. 2002;168: 3536-42.
- BELKAID Y, VON STEBUT E, MENDEZ S, LIRA R, CALER E, BERTHOLET S, UDEY MC, SACKS D. **CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/c mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major***. J Immunol 2002; 168: 3992-4000.
- BELKAID Y. **The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Leishmania infection**. Expert Opin Biol Ther. 2003;3: 875-85.
- BENDELAC A, RIVERA MN, PARK SH, ROARK JH. **Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity and function**. Annu Rev Immunol 1997; 15: 535-562.
- BOGDAN C, VODOVOTZ Y, NATHAN C. **Macrophage deactivation by interleukin 10**. J Exp Med 1991; 174: 1549-1555.
- BRITTINGHAM A, MORRISON CJ, McMASTER WR, McGWIRE BS, CHANG KP, MOSSER DM. **Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis**. J Immunol 1995;155:3102-11.



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

BROWN JA, TITUS RG, NABAVI N, GLIMCHER LH. **Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-regulating the TH2 response**. J Infect Dis 1996; 174: 1303-1308.

BUATES S, MATLASHEWSKI G. **General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection**. J Immunol 2001;166(5):3416-22.

CAMPBELL KA, OVENDALE PJ, KENNEDY MK, FANSLOW WC, REED SG, MALISZEWSKI CR. **CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major***. Immunity 1996; 4: 283-289.

CARVALHO EM, BADARÓ R, REED SG, JONES TC, JOHNSON Jr WD. **Absence of gamma interferon and interleukin-2 production during active visceral leishmaniasis**. J Clin Invest 1985; 76: 2066-2069.

CARVALHO EM, BARRAL A, PEDRAL-SAMPAIO D, BARRAL-NETTO M, BADARO R, ROCHA H, JOHNSON Jr WD. **Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi***. J Infect Dis 1992; 165: 535-540.

CARVALHO EM, BACELLAR O, BROWNELL C, REGIS T, COFFMAN RL, REED SG. **Restoration of IFN- $\gamma$  production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis**. J Immunol 1994; 152: 5949-5956.

CARVALHO LP, SOTO M, JERÔNIMO S, DONDI B, BACELLAR O, LUZ V, ORGE G, ALONSO C, JESUS AR, CARVALHO EM. **Characterization of immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens**. Microbes Infect 2003; 5: 7-12.

CENINI P, BERHE N, HAILU A, MCGINNES K, FROMMEL D. **Mononuclear cell subpopulation and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy**. J Infect Dis 1993; 168: 986-993.

CHANG KP. **Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in *Leishmania donovani*-human phagocyte interactions *in vitro***. Am J Trop Med Hyg 1981; 30: 334-9.

CILLARI E, VITALE G, ARCOLEO F, D'AGOSTINO P, MOCCIARO C, GAMBINO G, MALTA R, STASSI G, GIORDANA C, MILANO S, MANSUETO S. ***In vivo* and *in vitro* cytokine profiles and mononuclear cell subsets in sicilian patients with active visceral leishmaniasis**. Cytokine 1995; 7: 740-745.

CORREA-OLIVEIRA R, RODRIGUES CALDAS I, MARTINS-FILHO OA, CARVALHO QUEIROZ C, LAMBERTUCCI JR, RENAN CUNHA-MELO J, SOARES SILVEIRA A, PRATA A, WILSON A, GAZZINELLI G. **Analysis of the effects of treatment of**

**human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas.** Acta Trop. 2000; 77(1):141-6.

COSTA RS, D'OLIVEIRA JR A, JERÔNIMO S, BACELLAR O, CARVALHO EM. **T cell response of asymptomatic *Leishmania chagasi* infected subjects to recombinant *Leishmania* antigens.** Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: 367-370.

COTTERELL SEJ, ENGWERDA CR, KAYE PM. ***Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner.** Eur J Immunol 1999; 29: 203-214.

COTTERELL SEJ, ENGWERDA CR, KAYE PM. **Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*.** Infect Immun 2000; 68: 1840-1848.

CRISPE IN, MEHAL WZ. **Strange brew: T cells in the liver.** Immunol Today 1996; 17: 522-525.

de ALMEIDA MC, CARDOSO SA, BARRAL-NETTO M. ***Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage.** Int J Parasitol 2003; 33: 153-162.

de ALMEIDA MC, VILHENA V, BARRAL A, BARRAL-NETTO M. **Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 861-870.

DUGAS B, MOSSALAYI MD, DAMAIS C, KOLB JP. **Nitric oxide production by human monocytes: evidence for a role of CD23.** Immunol Today. 1995;16(12):574-80.

ENGWERDA CR, SMELT SC, KAYE PM. **An in vivo analysis of cytokine production during *Leishmania donovani* infection in seid mice.** Exp Parasitol 1996; 84: 195-202.

FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, VIEIRA P, MOSMANN TR, HOWARD M, MOORE KW, O'GARRA A. **IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.** J Immunol. 1991; 146: 3444-3451a.

FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, MOSMANN TR, HOWARD M, O'GARRA A. **IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.** J Immunol 1991; 147: 3815-3822b.

FRANKENBERGER M, STERNSDORF T, PECHUMER H, PFORTE A, ZIEGLER-HEITBNOCK HW. **Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis.** Blood 1996; 87: 373.

FRAUWIRTH KA, THOMPSON CB. **Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation.** J Clin Invest. 2002;109(3):295-9.

Fundação Nacional de Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

GALVÃO-CASTRO B, SA FERREIRA JÁ, MARZOCHI KF, MARZOCHI MC, COUTINHO SG, LAMBERT PH. **Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis**. Clin Exp Immunol 1984; 56: 58-66.

GHALIB HW, WHITTLE JA, KUBIN M, HASHIM FA, EL-HASSAN AM. **Interleukin 12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections**. J Immunol 1995; 154: 4623-4629.

GIFAWESEN C, FARRELL JP. **Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters**. Infect Immun 1989; 57: 3091-3096.

GREEN PJ, FEIZI T, STOLL MS, THIEL S, PRESCOTT A, McCONVILLE MJ. **Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein**. Mol Biochem Parasitol. 1994;66:319-28.

HAILU A, BAARLE D, KNOL GJ, BERHE N, MIEDEMA F, DAGER PA. **T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani***. Clinical Immunol 2005; 117: 182-191.

HANSCH GM, WAGNER C. **Expression of MHC class II antigen and coreceptor molecules in polymorphonuclear neutrophils**. Chem Immunol Allergy 2003;83:45-63.

HARMS G, PEDROSA C, OMENA S, FELDMEIER H, ZWINGENBERGER K. **Natural Killer cell activity in visceral leishmaniasis**. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991; 85: 54-55.

HO JL, BADARÓ R, SCHWARTZ A, DINARELLO CA, GELFAND JÁ, SOBEL J, ARRAL A, BARRAL-NETTO M, CARVALHO EM, REED SG, JOHNSON Jr WD. **Diminished *in vitro* production of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  during acute visceral leishmaniasis and recovery after therapy**. J Infect Dis 1992; 165: 1094-1102.

HOLADAY BJ, **Role of CD8<sup>+</sup> T cells in endogenous interleukin-10 secretion associated with visceral leishmaniasis**. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95: 217-220.

HOLADAY BJ, POMPEU MML, JERÔNIMO S, TEIXEIRA MJ, SOUZA AQ, VASCONCELOS AW, PEARSON RD, ABRAMS JS, LOCKSLEY RM. **Pontential role for interleukin-10 in the immunosuppression associatad with kala-Azar**. J Clin Invest 1993; 92: 2626-2632 a.

ISHIDA H, HASTINGS R, KEARNEY J, HOWARD M. **Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells.** J Exp Med. 1992;175(5):1213-20.

JULIA V, GLAICHENHAUS N. **CD4(+) T cells which react to the Leishmania major LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice.** Infect Immun. 1999; 67:3641-4.

JANEWAY C A, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK M. **Imunobiologia: o sistema immune na saúde e na doença.** 5ª edição Porto Alegre: Artmed, 2002. 767p.

KAYE PM. **Costimulation and the regulation of antimicrobial immunity.** Immunol Today 1995; 16: 423-427.

KEMP M, THEANDER TG, KHARAZMI A. **The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example.** Immunol Today 1996;17(1):13-6.

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

LAGLER H, WILLHEIM M, TRAUNMULLER F, WAHL K, WINKLER H, RAMHARTER M, GRANINGER W, WINKLER S. **Cellular profile of cytokine production in a patient with visceral leishmaniasis:  $\gamma\delta^+$  T cells express both type 1 cytokines and interleukin-10.** Scand J Immunol 2003; 57: 291-295.

LAINSON R, SHAW JJ. **Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis.** Academic Press Inc 1987; 1-20.

LAZZARIN A, ORLANDO G, GALLI M, ESPOSITO R. **Defect of leukocyte functions and circulating immune complexes in visceral leishmaniasis.** Boll Ist Sieroter Milan 1985; 64: 146-149.

LIMA GMAC, VALLOCHI AL, SILVA UR, BEVILACQUA EMAF, KIFFER MMF, ABRAHAMSOHN IA. **The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis.** Immunol Lett 1998; 64: 145-151.

LOCKSLEY RM, HEINZEL FP, SADICK MD, HOLADAY BJ, GARDNER KD Jr. **Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets.** Ann Inst Pasteur Immunol 1987; 138: 744-749.

LOUZIR H, BELAL-KACEMI L, SASSI A, LAOUINI D, BEM ISMAIL R, DELLAGI K. **Natural autoantibodies, IgG antibodies to tetanus toxoid and CD5<sup>+</sup> B cells in patients with Mediterranean visceral leishmaniasis.** Clin Exp Immunol 1994; 95: 479-784.

MAGALHÃES PA, MAYRINK W, COSTA CA da, MELO MN, DIAS M, BATISTA SM, MICHALICK MSM, WILLIAMS P. **Calazar na zona do Rio Doce - Minas Gerais.**

- Resultados das medidas profiláticas.** Rev Inst Med Trop São Paulo 1980; 22: 197-202.
- MANNA PP, BHARADWAJ D, BHATTACHARYA S, CHAKRABARTI G, BASU D, MALLIK KK, BANDYOPADHYAY S. **Impairment of natural killer cell activity in Indian kala-azar: restoration of activity by interleukin 2 but not by alpha or gamma interferon.** Infect Immun 1993; 61: 3565-3569.
- MANNA PP, CHAKRABARTI G, BHATTACHARYA S, MALLIK KK, BASU D, BANDYOPADHYAY S. **Plasma of Indian kala-azar patients suppresses natural killer cell activity *in vitro*.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88: 247-248.
- MARTINS FILHO OA, MELLO JR, CORREA-OLIVEIRA R. **The spleen is an important site of T cell activation during human hepatosplenic schistosomiasis.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93 Suppl 1:159-64.
- MARY C, AURIAULT V, FAUGERE B, DESSEIN A. **Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8+ and gamma interferon and interleukin-5-producing CD4+ antigen-specific T cells.** Infect Immun 1999; 67: 5559-5566.
- MATTHEWS DJ, EMSON CI, MCKENZIE GJ, JOLIN HE, BLACKWELL JM, MCKENZIE NA. **IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection.** J Immunol 2000; 164: 1458-1462.
- MELBY PC, TABARES A, RESTREPO BI, CARDONA AE, MCGUFF HS, TEALE JM. ***Leishmania donovani*: Evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection.** Exp Parasitol 2001; 99: 17-25 a.
- MELBY PC, CHANDRASEKAR B, ZHAO W, COE JE. **The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response.** J Immunol 2001; 166: 1912-1920 b.
- MIRALLES GD, STOECKLE MY, MCDERMOTT DF, FINKELMAN FK, MURRAY HW. **Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis.** Infect Immun 1994; 62: 1058-1063.
- MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL. **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** J Immunol 1986; 136:2348-2357.
- MULLER K, VAN ZANDBERGEN G, HANSEN B, LAUFS H, JAHNKE N, SOLBACH W, LASKAY T. **Chemokines, natural killer and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice.** Med Microbiol Immunol 2001; 190: 73-76.
- MURRAY HW, SQUIRES KE, MIRALLES CD, STOECKLE MY, GRANGER AM, GRANELLI-PIPERNO A, BOGDAN C. **Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity.** J Immunol 1992; 148: 1858-1863.

- MURRAY HW. **Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis.** J Infect Dis 1997; 175: 1477-1479.
- MURRAY HW, NATHAN CF. **Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*.** J Exp Med 1999; 189: 741-746.
- NYLEN S, MAASHO K, SODERSTROM K, ILG T, AKUFFO H. **Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma.** Clin Exp Immunol 2003; 131: 457-467.
- NOBEN NN, WILSON ME, LYNCH RG. **Modulation of the low-affinity IgE Fc receptor (Fc epsilon RII/CD23) by *Leishmania chagasi*.** Int Immunol 1994; 6: 935-945.
- NOBEN-TRAUTH N, LIRA R, NAGASE H, PAUL WE, SACKS DL. **The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*.** J Immunol 2003; 170: 5152-5158.
- OLIVEIRA SHP, FONSECA SG, ROMÃO PRT, FERREIRA SH, CUNHA FQ. **Nitric oxide mediates the microbicidal activity of eosinophils.** Mem Inst Osw Cruz 1997; 92: 233-235.
- OLIVEIRA SHP, FONSECA SG, ROMÃO PRT, FIGUEIREDO F, FERREIRA SH, CUNHA FQ. **Microbiology activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway.** Parasite Immunol 1998; 20: 405-412.
- Organização Mundial de Saúde. **Epidemiology and control of Leishmaniasis.** Technical Report Series. Geneva: WHO; 2003.
- PEARSON RD, STEIGBIGEL RT. **Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes.** J Immunol 1981; 127: 1438-1443.
- PEARSON RD, UYDESS IL, CHAPMAN SW, STEIGBIGEL RT. **Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*.** Ann Trop Med Parasitol 1987; 81: 735-739.
- PEARSON RD, COX G, EVANS T, SMITH DL, WEIDEL D, CASTRACANE J. **Wasting and macrophage production of tumor necrosis factor/cachectin and interleukin-1 in experimental visceral leishmaniasis.** Am J Trop Med Hyg 1990; 43: 640-649.
- PERUHYPE-MAGALHÃES V P. **Estudo da influência da infecção por *Leishmania chagasi* e, do impacto da terapêutica específica eficaz, no perfil imunológico de indivíduos portadores de Leishmaniose Visceral.** 2005. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Programa de Pós-Graduação do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.
- RANGER AM, PRABHU Das M, KUCHROO VK, GLIMCHER LH. **B7-2 (CD86) is essential for the development of IL-4 producing T cells.** Int Immunol 1996; 8: 1549-1560.

RAZIUDDIN S, ABDALLA RE, EL-HAG, AL-JANADI M. **Immunoregulatory and proinflammatory cytokine production in visceral and cutaneous leishmaniasis.** J Infect Dis 1994; 170: 1037-1040.

REINER NE, Ng W, McMASTER WR. **Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products.** J Immunol 1987; 138:1926-32.

REINER SL, ZHENG S, WANG ZE, STOWRING L, LOCKSLEY RM. ***Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+T cells during initiation of infection.** J Exp Med 1994; 179: 447-456.

ROUSSEAU D, DEMARTINO S, FERRUA B, MICHIELS JF, ANJUERRE F, FRAGAKI K, LE FICHOUX Y, DUBAR J. **In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection.** BMC microbial 2001; 1: 17-23.

SAITO T. **Negative regulation of T cell activation.** Curr Opin Immunol 1998; 10: 313-321.

SCHARTON TM, SCOTT P. **Natural killer cells are source of interferon- $\gamma$  that drives differentiation of CD4+subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice.** J Exp Med 1993; 178: 567-577.

SCHARTON-KERSTEN TM, AFONSO LC, WYSOCKA M, TRINCHIERI G, SCOTT P. **IL-12 is required for natural killer-cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis.** J Immunol 1995; 154: 5320-5330.

SCHARTON-KERSTEN TM, SHER A. **Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections.** Curr Opin Immunol 1997; 9: 44-51.

SHARPE AH, FREEMAN GJ. **The B7-CD28 superfamily.** Nat Rev Immunol 2002; 2(2):116-26.

SMELT SC, ENGWERDA CR, McCROSSEN M, KAYE PM. **Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral Leishmaniasis.** J Immunol 1997; 158: 3813-3821.

SMELT SC, COTTERELL SEJ, ENGWERDA CR, KAYE PM. **B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology.** J Immunol 2000; 164: 3681-3688.

SWIHART K, FRUTH U, MESSMER N, HUG K, BEHIN R, HUANG S, DEL GIUDICE G, AGUET M, LOUIS JA. **Mice from a genetically resistant background lacking the interferon-gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T-cell response.** J Exp Med 1995; 181: 961-971.

TACCHINI-COTTIER F, ZWEIFEL C, BELKAID Y, MUKANKUNDIYE C, VASEI M, LAUNOIS P, MILON G, LOUIS JA. **An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major***. J Immunol 200; 165: 2628-2636.

TAGA K, TOSATO G. **IL-10 inhibit T cell proliferation and IL-2 production**. J Immunol 1992; 148: 1143-1148.

TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, ANDRADE ZA, CUNHA-MELLO JR, WILSON RA, CORREA-OLIVEIRA R. **The study of T-cell activation in peripheral blood and spleen of hepatosplenic patients suggests an exchange of cells between these two compartments in advanced human *Schistosomiasis mansoni* infection**. Scand J Immunol. 2002;56(3):315-22.

TEIXEIRA-CARVALHO A, ANDRADE Z A, MELO JRC, CORRÊA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO OA. **The spleen during human severe hepatosplenic schistosomiasis**. Current Trends in Immunology 2003; 5: 73-80.

TSAGOZIS P, KARAGOUNI E, DOTSIKA E. **CD8(+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis**. Parasite Immunol 2003; 25: 569-579.

VENUPRASAD K, BANERJEE PP, CHATTOPADHYAY S, SHARMA S, PAL S, PARAB PB, MITRA D, SAHA B. **Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN-gamma secretion and restriction of *Leishmania* growth**. J Immunol. 2002;169:920-8.

VERONESI R, FOCACCIA R. **Veronesi: Tratado de Infectologia**. 2ª edição São Paulo: ATHENEU, 2004. 1785p.

VITELLI DM. **Estudo da resposta imune de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da doença de Chagas: Ênfase em aspectos fenotípicos celulares e moleculares do sangue periférico**. 2004. Tese (Mestrado em Imunologia) - Programa de Pós- Graduação do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VITELLI-AVELAR DM, SATHLER-AVELAR R, DIAS JC, PASCOAL VP, TEIXEIRA-CARVALHO A, LAGE PS, ELOI-SANTOS SM, CORREA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO OA. **Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes**. Scand J Immunol 2005;62(3):297-308.

VOULDOUKIS I, ISSALY F, FOURCADE C, PAUL-EUGENE N, AROCK M, KOLB JP, da SILVA OA, MONJOUR L, POINSOT H, TSELENTIS Y, DUGAS B, DEBRÉ P, MOSSALAYI MD. **CD23 and IgE expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis: possible role in monocyte activation**. Res Immunol. 1994;145(1):17-27.



VOULDOUKIS I, BECHEREL PA, RIVEROS-MORENO V, AROCK M, da SILVA O, DEBRE P, MAZIER D, MOSSALAYI MD. **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. 1997;27(4):860-5.

WATANABE Y, HAMAGUCHI-TSURU E, MORIMOTO N, NISHIO Y, YAGYU K, KONISHI Y, TOMINAGA M, MIYAZAKI J, FURUYA M, TOMINAGA A. **IL-5-Induced Eosinophils Suppress the Growth of *Leishmania amazonensis* In Vivo and Kill Promastigotes In Vitro in Response to Either IL-4 or IFN-gamma.** DNA Cell Biol 2004; 23: 412-418.

WITKO-SARSAT V, RIEU P, DESCAMPS-LATSCHA B, LESAVRE P, HALBWACHS-MECARELLI L. **Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects.** Lab Invest 2000; 80: 617-653.

WOERLY G, ROGER N, LOISEAU S, DOMBROWICZ D, CAPRON A, CAPRON M. **Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes.** J Exp Med. 1999;190(4):487-95.

Estudo de alterações fenotípicas em células da imunidade inata e adaptativa na  
infecção por *Leishmania (L.) chagasi*

---

ANEXOS

***Anexo A - Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FIOCRUZ***



Ministério da Saúde  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FIOCRUZ

PARECER

Deliberação: **PROCOLO APROVADO**

Titulo do Projeto: **Estudo da Resposta Imune Celular e Humoral em Pacientes Portadores de Leishmaniose.**

Protocolo: 0070/99 – CEP/FIOCRUZ

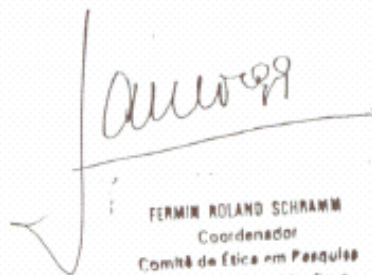
Pesquisador(a) Responsável: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Instituição: Centro de Pesquisa René Rachou

Trata-se de um projeto a ser desenvolvido em colaboração com a Universidade Federal de Minas Gerais e a Faculdade do Triângulo Mineiro, tendo como objetivo principal, analisar a resposta imune celular (determinação do fenótipo de leucócitos do sangue periférico e do padrão de produção de citocinas após estimulação específica com Ag de *Leishmania*) e humoral (análise do perfil isotípico de anticorpos e anti-*Leishmania* no soro) de pacientes de diferentes formas clínicas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e de Leishmaniose Visceral (LV).

A deliberação deste Comitê baseou-se na análise dos seguintes documentos, projeto de pesquisa, protocolado em 26/04/99, e informações constantes nas respostas às nossas solicitações, recebidas em 22/7/99, anexadas ao protocolo. Após análise dos aspectos éticos, conforme Res. CNS 196/96, decidiu-se pela APROVAÇÃO do estudo, e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, anexo.

Rio de Janeiro, 16 de agosto de 1999.

  
FERMIN ROLAND SCHRAMM  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Fundação Oswaldo Cruz

***Anexo B - Termo de livre consentimento livre e esclarecimento para pacientes voluntários***



Ministério da Saúde

 FIOCRUZ  
 Fundação Oswaldo Cruz

 Centro de Pesquisas René Rachou  
 Laboratório de Imunologia Celular e Molecular

*Texto aprovado após  
resposta às solicitações do CEI  
Mário  
10.8.99*

 FERNANDA CARNEIRO  
 Secretária Geral  
 Comitê de Ética em Pesquisa  
 Fundação Oswaldo Cruz

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes Voluntários**
**Instituição:** Centro de Pesquisas Rene Rachou – Fundação Oswaldo Cruz

**Projeto:** "Estudo da resposta imune celular e humoral em pacientes portadores de Leishmaniose"

**Investigadores:** Olindo Assis Martins Filho, Roberta Rodrigues Rocha, Odair Genaro, Wilson Mayrink, Rodrigo Correa-Oliveira, Aluisio Prata e Regina Lunard

Eu, \_\_\_\_\_, na qualidade de suspeito de portar Leishmaniose, recebi informações sobre a natureza do projeto de pesquisa intitulado "Estudo da resposta imune celular e humoral em pacientes portadores de Leishmaniose" que pretende estudar os mecanismos imunológicos da Doença, as defesas do paciente contra a agressão do parasito e as características biológicas deste. Ciente que as informações obtidas por este tipo de investigação podem auxiliar na compreensão dos mecanismos do surgimento das lesões e de evolução da doença e, consequentemente, no manejo clínico dos pacientes, concordei em ceder amostras de meu sangue para a realização dos estudos indicados pelo meu médico assistente. O procedimento será o seguinte: um volume de 10 ml de sangue será obtido por punção da veia do ante-braço, podendo, em algum outro momento da pesquisa eu ser solicitado para uma nova coleta de sangue. Estas novas amostras de sangue serão coletadas em casos de eventuais perdas da amostra por acidentes ou incidentes que acarretem o atraso no envio da amostra para o laboratório de pesquisas em Belo Horizonte, e após o tratamento, para monitoramento do processo de cura da infecção. Fui informado de que não devo esperar resultados imediatos ou pessoais e de que eventual recusa em participar do projeto não me impedirá de continuar recebendo toda a atenção médica necessária. Fui informado, ainda, as informações contidas em meu prontuário são sigilosas, confidenciais e a privadas, e que posso estar garantido que terei acesso a estas informações durante todo o curso da pesquisa, por meio de contato direto com os pesquisadores pelo telefone (0\_\_ 31 2953566 ramal 165).

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Paciente: \_\_\_\_\_

Médico: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_

 RECEBIDO \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/IFF-FIOCRUZ  
 Mat: \_\_\_\_\_