

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

Ricardo Luiz Fontes Moreira

**ESTUDO FENOTÍPICO DAS SUBPOPULAÇÕES DE
LINFÓCITOS T E MONÓCITOS, ESTIMULADOS OU NÃO
COM ANTÍGENO SOLÚVEL DE *LEISHMANIA*, EM
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL PRÉ E
PÓS-TRATAMENTO ESPECÍFICO**

Belo Horizonte
2009

Ricardo Luiz Fontes Moreira

**ESTUDO FENOTÍPICO DAS SUBPOPULAÇÕES DE
LINFÓCITOS T E MONÓCITOS, ESTIMULADOS OU NÃO
COM ANTÍGENO SOLÚVEL DE *LEISHMANIA*, EM
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL PRÉ E
PÓS-TRATAMENTO ESPECÍFICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Ciências da Saúde – Infectologia e Medicina Tropical

Orientadora: Dra. Regina Lunardi Rocha

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina – UFMG
2009**



**Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical**

Prof. Ronaldo Tadêu Pena
Reitor

Profa. Heloisa Maria Murgel Starling
Vice-Reitora

Prof. Elisabeth Ribeiro da Silva
Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares
Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Francisco José Penna
Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Tarcizo Afonso Nunes
Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Carlos Faria Santos Amaral
Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Joel Alves Lamounier
Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. José Carlos Bruno da Silveira
Chefe do Departamento de Clínica Médica

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha
**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical**

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior
**Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical**

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro
Prof. José Roberto Lambertucci
Prof. Ricardo de Amorim Corrêa
Jader Bernardo Camponizzi (Disc. Titular)
José Adalberto Leal (Disc. Suplente)

**Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical**

Aos meus pais, Valter e Conceição (*in memoriam*),
grandes incentivadores.

A minha esposa Fabiane e meu filho Matheus,
grandes amores.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por fazer bem todas as coisas, mesmo as que em um primeiro momento não me parecem boas.

Aos meus pais, Valter e Conceição (*in memoriam*), que me deram a vida e com paciência e amor me incentivaram e me fizeram chegar até aqui.

À minha esposa Fabiane, pela cumplicidade e amor a cada dia, pela paciência e compreensão nas ausências pelo trabalho e estudo.

Ao meu filho Matheus, presente de Deus no caminho deste mestrado, que com sua alegria e seu sorriso tornam leve toda a rotina diária.

À professora Regina Lunardi, pela oportunidade deste trabalho, pela orientação, incentivo e paciência; pelo apoio e por acreditar desde o início que nosso trabalho se concretizaria.

Ao professor Manoel Otávio, que pelo amor à ciência, em qualquer conversa corriqueira, me reacende sempre a chama da busca do conhecimento.

À professora Walderez Ornelas Dutra, coordenadora do Laboratório de Biologia das Interações Celulares, grande colaboradora, que abriu as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar este trabalho, e participou ativamente na estruturação de todas as etapas do estudo.

Ao professor Kenneth Gollob, pelo apoio no Laboratório de Biologia de Linfócitos.

À Tatjana pela paciência e disponibilidade em ensinar e ajudar. Sem seus ensinamentos e ajuda os caminhos teriam sido muito mais difíceis.

A equipe do LBIC: Érica, Daniela, Germano, Micena, Janete, Fernanda, Diego e Sabrina que nas ajudas concretas, nos pequenos comentários, nas dicas, ou apenas nos sorrisos me ajudaram a fazer este trabalho.

À Dra. Maria Vitória, pelo apoio no acompanhamento dos pacientes do Hospital Infantil João Paulo II.

Ao Dr. Reynaldo Dietze, pelos testes rápidos para diagnóstico da leishmaniose visceral.

Aos amigos da CCIH do HC/UFMG, em especial a Dra. Rosane Coutinho, que me apoiaram diariamente no caminho deste mestrado.

A todos que ajudaram na realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Hospital das Clínicas da UFMG, o Hospital Infantil João Paulo II – FHEMIG, o Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LBIC/ICB/UFMG – Dra. Walderez Ornelas Dutra) e o Laboratório de Biologia de Linfócitos (ICB/UFMG – Dr. Kenneth Gollob).

“Quem pergunta permanece ignorante durante somente cinco minutos,
mas quem não pergunta será um ignorante para sempre”.

(Provérbio Chinês)

RESUMO

A leishmaniose é uma doença parasitária que afeta 12 milhões de pessoas em todo o mundo. O espectro clínico da leishmaniose visceral (LV) varia desde as formas assintomáticas até as graves, e o controle da infecção é influenciado pela relação parasita-hospedeiro. A LV ativa apresenta complexa resposta imune, com correção de citocinas pró e anti-inflamatórias e aumento sérico de IFN- γ e IL-10. Este trabalho avaliou, por intermédio da citometria de fluxo, linfócitos T e monócitos do sangue periférico, estimulados ou não com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), de oito pacientes, antes e após o tratamento da LV. Objetivando entender melhor o papel que podem ter as subpopulações celulares, avaliou-se a expressão de moléculas de experiência/memória, de coestimulação e de citotoxicidade e a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Os resultados demonstraram que: (i) os pacientes com LV, antes do tratamento específico, aumentaram a frequência de linfócitos T CD4⁺ produzindo IFN- γ após estimulação com SLA; (ii) a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ apresentou diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17 após o tratamento específico; (iii) o SLA induziu aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO e diminuição da frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ nos pacientes após tratamento da LV; (iv) observou-se redução na frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO, Granzima A, IFN- γ e TNF- α quando comparados pré e pós-tratamento específico da LV; (v) observou-se correlação positiva entre monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α e produtores de IL-10. Estes resultados não esclarecem todo mecanismo imune na LV, porém a caracterização inicial e a determinação das diferentes funções das subpopulações linfocitárias e de monócitos no sangue periférico podem ser importantes para novas pesquisas, terapêuticas e vacinas.

Palavras-chave: leishmaniose visceral. resposta imune. citometria de fluxo. linfócitos T. monócitos. citocinas.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic disease which affects about 12 million people worldwide. Similar to other infectious diseases, visceral leishmaniasis (VL) clinical spectrum and infection control are biased by host-parasite relationship, since the asymptomatic up to the most severe ones. Visceral leishmaniasis presents a complex immune response with corregulation among inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Previous researches have shown an increase in INF-gamma and IL-10 serum cytokines when compared with healthy controls. Thus, this study evaluated in peripheral blood T lymphocytes and monocytes, with or without soluble *Leishmania* antigen (SLA) stimulus, before and after VL treatment into eight VL patients by flow cytometry. In order to better understand the role of cell subpopulations, we evaluated experienced/memory molecules expression, coestimulation, cytotoxicity and pro and anti-inflammatory cytokines production. The results showed: (i) increase in INF-gamma producing T CD4⁺ cells in patients before treatment, after SLA stimulus; (ii) decrease in INF-gamma and IL-17 producing T CD4⁺ cells, after VL treatment; (iii) increase in CD45RO expressing T CD8⁺ cells and decrease in IFN-gamma producing T CD8⁺ cells, both SLA-induced, from VL patients after specific treatment; (iv) decrease in CD45RO, granzyme A, INF-gamma and TNF-alpha producing T CD8⁺ cells when compared before and after VL treatment; (v) and a positive correlation between TNF-alpha and IL-10 producing CD 14⁺ monocytes. While these results do not clarify the whole immune mechanism related with visceral leishmaniasis, the determination of distinct functions of lymphocytes and monocytes subpopulations in the peripheral blood may be relevant to new researches, treatment and vaccines.

KEYWORDS: visceral leishmaniasis, immune response, flow cytometry, T lymphocytes, monocytes, cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DN	Células duplo negativas
ELISA	Ensaio imunossorbente ligado a enzima
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HLA-DR	Antígeno de histocompatibilidade linfocitária - DR
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IFN- γ	Interferon gama
LACK	Homólogos de <i>Leishmania</i> para receptores de proteína cinase C ativada
LBIC	Laboratório de Biologia das Interações Celulares
LV	Leishmaniose visceral
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	RNA mensageiro (ácido ribonucléico mensageiro)
NK	Células <i>natural killer</i>
PBS	Solução tampão fosfato
PCR	Reação da cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PECy5	Ficoeritrina cy-chrome 5
SLA	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
TCR	Receptor de célula T

TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
Th1	Células T auxiliares do tipo 1
Th2	Células T auxiliares do tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1: Perfil da distribuição de células do sangue periférico no gráfico de tamanho <i>versus</i> granulosidade (A) e controle de isotipo de linfócitos (B) e de monócitos (C).....	49
Figura 4.2: “Dot plot” e histograma representativos dos linfócitos T CD4 ⁺ totais e da expressão de CD45RO dentro dessa subpopulação	50
Figura 5.1: Comparação da média de frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando CD45RO em pacientes tratados para leishmaniose visceral antes e após estímulo antígeno específico	55
Figura 5.2: Comparação da média de linfócitos T CD4 ⁺ produtores de IFN- γ em pacientes com leishmaniose visceral pré-tratamento específico, antes e após estímulo antígeno específico.....	57
Figura 5.3: Comparação da média de linfócitos T CD8 ⁺ produtores de IFN- γ em pacientes tratados para leishmaniose visceral, antes e após estímulo antígeno específico	59
Figura 5.4: Comparação da média de linfócitos T CD4 ⁻ CD8 ⁻ (DN) expressando TCR $\gamma\delta$ em pacientes com leishmaniose visceral pré-tratamento, antes e após estímulo antígeno específico.....	61
Figura 5.5: Comparação da frequência média de linfócitos T CD8 ⁺ não estimulados com SLA expressando CD45RO em pacientes com leishmaniose visceral pré e pós-tratamento específico.....	62

Figura 5.6: Comparação da frequência média de linfócitos T CD8 ⁺ estimulados com SLA expressando CD45RO em pacientes com leishmaniose visceral pré e pós-tratamento específico	63
Figura 5.7: Comparação da frequência média de linfócitos T CD4 ⁺ produtores de IFN- γ em pacientes com leishmaniose visceral pré e pós-tratamento específico, antes e após estímulo com SLA.....	64
Figura 5.8: Comparação da frequência média de linfócitos T CD4 ⁺ produtores de IL-17 não estimulados com SLA, em pacientes com leishmaniose visceral pré e pós-tratamento específico	65
Figura 5.9: Comparação da média da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ produtores de Granzima A não estimulados com SLA, de pacientes com leishmaniose visceral pré e pós-tratamento específico	66
Figura 5.10: Comparação da média da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ produtores de IFN- γ estimulados (B) ou não (A) com SLA, de pacientes com leishmaniose visceral pré e pós-tratamento específico	67
Figura 5.11: Comparação da média da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ produtores de TNF- α estimulados (B) ou não (A) com SLA, de pacientes com leishmaniose visceral pré e pós-tratamento específico	68
Figura 5.12: Comparação da média da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ CD28 ⁻ produtores de IL-10 após estimulação com SLA, em pacientes com leishmaniose visceral pré e pós-tratamento específico	69
Figura 5.13: Comparação da média da frequência de monócitos CD14 ⁺ produtores de TNF- α após estimulação com SLA, de pacientes com leishmaniose visceral pré e pós-tratamento específico	71

Figura 5.14: Correlação entre linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e linfócitos T CD4⁺CD28⁺ em pacientes pré-tratamento para LV, antes do estímulo com SLA 72

Figura 5.15: Correlação entre linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO (A), Granzima A (B) e IL-10 (C) em pacientes pré-tratamento para LV, antes do estímulo com SLA 74

Figura 5.16: Correlação entre linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO e linfócitos T CD8⁺ expressando Granzima A em pacientes pré-tratamento para LV, antes do estímulo com SLA 75

Figura 5.17: Correlação entre a porcentagem total de monócitos e a porcentagem de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α (A) e correlação entre a porcentagem total de monócitos e a porcentagem de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10 (B) em pacientes pré-tratamento para LV, antes do estímulo com SLA 76

Figura 5.18: Correlação entre a porcentagem de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α e a porcentagem de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10 em pacientes pré-tratamento para LV, antes do estímulo com SLA 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Características demográficas, tempo de início dos sintomas e características laboratoriais dos pacientes com leishmaniose visceral pré-tratamento	43
Tabela 5.1: Porcentagem média de linfócitos T CD4 ⁺ expressando IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10 de pacientes com leishmaniose visceral, pré e pós-tratamento, antes e após estímulo com SLA.....	57
Tabela 5.2: Porcentagem média de linfócitos T CD8 ⁺ expressando Granzima A, IFN- γ , TNF- α e IL-10 de pacientes com leishmaniose visceral, pré e pós-tratamento, antes e após estímulo com SLA.....	58
Tabela 5.3: Porcentagem média de linfócitos T CD4 ⁺ CD28 ⁻ expressando TNF- α e IL-10, em pacientes com leishmaniose visceral, pré e pós-tratamento, antes e após estímulo com SLA	70
Tabela 5.4: Porcentagem média de monócitos CD14 ⁺ expressando TNF- α e IL-10 de pacientes com leishmaniose visceral, pré e pós-tratamento, antes e após estímulo com SLA	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 LEISHMANIOSES	23
2.2 CICLO DE VIDA DA <i>LEISHMANIA</i> NA LEISHMANIOSE VISCERAL	23
2.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	24
2.4 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	26
2.5 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	27
2.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE.....	29
2.6.1 O modelo experimental murino	29
2.6.2 Aspectos imunológicos da leishmaniose visceral humana	32
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 PACIENTES E MÉTODOS	42
4.1 PACIENTES	42
4.1.1 Critérios de inclusão	42
4.1.2 Critérios de exclusão	42
4.1.3 Caracterização dos pacientes	43
4.1.4 Tamanho da amostra	44
4.2 MÉTODOS	44
4.2.1 História clínica e exame físico	44
4.2.2 Exames laboratoriais diagnósticos	44
4.2.3 Obtenção do antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>	45
4.2.4 Congelamento de células do sangue periférico.....	46
4.2.5 Descongelamento das células.....	46

4.2.6	Imunofluorescência para análise de linfócitos e monócitos do sangue periférico, de moléculas de superfície, citotoxicidade e citocinas.....	46
4.2.7	Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo.....	48
4.2.8	Análises estatísticas.....	51
4.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	51
5	RESULTADOS.....	53
5.1	DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADOR DE MEMÓRIA E PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL ANTES E APÓS ESTIMULAÇÃO COM SLA.....	53
5.1.1	Comparação da frequência de subpopulações de linfócitos T expressando CD45RO nos pacientes com Leishmaniose Visceral antes e após estímulo com SLA.....	53
5.1.1.1	Análise da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ expressando CD45RO de pacientes com Leishmaniose Visceral pré-tratamento específico, antes e após estímulo com SLA.....	53
5.1.1.2	SLA induz aumento na média de frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando CD45RO de pacientes pós-tratamento para Leishmaniose Visceral...	54
5.1.2	Comparação da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ expressando Granzima A e produzindo citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10 em pacientes com Leishmaniose Visceral antes e após estímulo com SLA.....	55
5.1.2.1	Análise da média de frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de Granzima A, IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10 em pacientes com Leishmaniose Visceral pré-tratamento específico, antes e após estímulo com SLA.....	56
5.1.2.2	Análise da média de frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de Granzima A, IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10 em pacientes tratados para Leishmaniose Visceral, antes e após estímulo com SLA.....	58
5.1.3	Comparação da frequência de linfócitos T duplo negativos CD4 ⁻ CD8 ⁻ (DN) expressando o TCR $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, pré e pós-tratamento específico para Leishmaniose, antes e após estímulo com SLA.....	59
5.1.3.1	Análise da expressão de TCR $\alpha\beta$ em linfócitos T CD4 ⁻ CD8 ⁻ (DN) em pacientes com Leishmaniose Visceral.....	60

5.1.3.2 Análise da expressão de TCR $\gamma\delta$ em linfócitos T CD4 ⁻ CD8 ⁻ (DN) em pacientes com Leishmaniose Visceral pré-tratamento, após estímulo com SLA	60
5.2 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADOR DE MEMÓRIA E PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM LINFÓCITOS E MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL PRÉ E PÓS-TRATAMENTO ESPECÍFICO	61
5.2.1 Comparação da frequência de subpopulações de linfócitos T expressando CD45RO nos pacientes com Leishmaniose Visceral pré e pós-tratamento específico	61
5.2.1.1 Diminuição na frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando CD45RO, antes de serem estimulados com SLA, em pacientes tratados para Leishmaniose Visceral	61
5.2.1.2 Diminuição na frequência de linfócitos T CD8 ⁺ , estimulados com SLA, expressando CD45RO, em pacientes tratados para Leishmaniose Visceral	62
5.2.2 Comparação da frequência de subpopulações de linfócitos expressando marcador de citotoxicidade e produzindo citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes com Leishmaniose Visceral pré e pós-tratamento	63
5.2.2.1 Diminuição da média de frequência de linfócitos T CD4 ⁺ produtores de IFN- γ antes e após estímulo com SLA e de linfócitos T CD4 ⁺ produtores de IL-17 não estimulados com SLA, em pacientes com Leishmaniose Visceral quando comparados pré e pós-tratamento	63
5.2.2.2 Diminuição da média de frequência de linfócitos T CD8 ⁺ produtores de Granzima A antes do estímulo com SLA e de linfócitos T CD8 ⁺ produtores de IFN- γ e TNF- α estimulados ou não com SLA, em pacientes com Leishmaniose Visceral quando comparados pré e pós-tratamento	65
5.2.2.3 Diminuição da média de frequência de linfócitos T CD4 ⁺ CD28 ⁻ produtores de IL-10 após estímulo com SLA, em pacientes com Leishmaniose Visceral pós-tratamento	68
5.2.3 Análise da frequência de monócitos CD14 ⁺ produtores de TNF- α e IL-10 de pacientes com Leishmaniose Visceral pré e pós-tratamento	70
5.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ E MONÓCITOS EXPRESSANDO CITOCINAS ANTES E APÓS ESTÍMULO COM SLA, EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL	71

5.3.1	Correlação entre a frequência de linfócitos T CD4 ⁺ produtores de citocina pró-inflamatória IFN- γ e a frequência de linfócitos T CD4 ⁺ expressando CD28	72
5.3.2	Correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando IFN- γ e a frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando CD45RO, Granzima A, e IL-10 nos pacientes com Leishmaniose Visceral pré-tratamento	73
5.3.3	Correlação entre a frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando CD45RO e frequência de linfócitos T CD8 ⁺ expressando Granzima A nos pacientes com Leishmaniose Visceral	74
5.3.4	Correlação positiva entre a frequência de monócitos e a frequência de monócitos CD14 ⁺ produtores de citocinas pró-inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10)	75
5.3.5	Correlação positiva entre a frequência de monócitos CD14 ⁺ produtores de citocinas pró-inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10).....	76
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÕES	87
8	PROPOSIÇÕES.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90
	APÊNDICES	101
	ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, encontradas em 88 países, com mais de 12 milhões de indivíduos infectados e 350 milhões de pessoas vivendo sob risco de infecção. A apresentação clínica da leishmaniose é variável, dependendo da espécie de *Leishmania* e de complexa interação parasita-hospedeiro. A doença pode ser dividida em três principais síndromes clínicas, de grande impacto para o homem: a leishmaniose cutânea, que pode levar a lesões cutâneas ulceradas graves; a leishmaniose mucocutânea, que pode causar lesões extensas e desfigurantes; e a leishmaniose visceral (ou calazar), a forma mais grave entre as doenças causadas pela *Leishmania*.

A leishmaniose visceral (LV) é causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, composto principalmente pela *L. (d) donovani*, *L. (d) infantum* e *L. (d) chagasi*; ocorrendo em 65 países, entre eles o Brasil (GUERIN, et al, 2002; DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004). No Brasil, a LV se manifesta como zoonose de cães, eventualmente atingindo o homem (ROCHA, 2009).

A doença é transmitida para o homem pela picada de flebotomíneos (PERSON; SOUSA, 1996). No Velho e no Novo Mundo a doença é transmitida pela picada de insetos do gênero *Phlebotomus* e do gênero *Lutzomyia*, respectivamente. O parasita apresenta duas formas distintas, a amastigota, com características arredondada, imóvel intra-celular, presente no hospedeiro vertebrado, e a promastigota, caracterizada por um estágio extra-celular, alongado e móvel, presente no vetor. As fêmeas de flebotomíneos transmitem a doença, pela inoculação das formas promastigotas na pele. A forma promastigota diferencia-se na forma amastigota dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos. As amastigotas se multiplicam e disseminam-se infectando células do sistema retículo-endotelial (SHARMA; SINGH, 2008).

Observam-se diferentes formas clínicas de apresentação da LV, desde formas assintomáticas até formas graves, com alta mortalidade (MURRAY et al, 2005). As diferentes formas de apresentação clínica dependem de fatores relacionados à virulência do parasita e à resposta imune do hospedeiro. A tríade clássica da LV é constituída por febre, por hepatoesplenomegalia e por pancitopenia (OSMAN; KAGER; OSKAM, 2000; MURRAY et al, 2005). A maior parte dos óbitos ocorre devido a complicações infecciosas ou sangramentos (NASCIMENTO; MEDEIROS, 2005; MURRAY et al, 2005).

O diagnóstico da LV pode ser feito pela associação entre a história clínica e epidemiológica e a observação direta do parasita em aspirado de medula óssea, aspirado esplênico ou aspirado de linfonodo, ou o exame sorológico positivo (CHAPPUIS et al, 2007; BRASIL, 2003).

A LV está associada à supressão celular na produção de citocinas de padrão Th1 (fenótipo de células T CD4⁺ auxiliares subtipo 1), como interleucina 2 (IL-2), interferon gama (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12) e aumento de produção de citocinas como interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) (KHARAZMI, 1999; CARVALHO et al, 1985; BACELLAR et al, 2000). A LV humana, entretanto, não apresenta padrão dicotomizado de resposta Th1/Th2, o que gera maior complexidade da resposta imune, com correção de citocinas pró e anti-inflamatórias, e aumento sérico de IFN- γ e IL-10 e diminuição na produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (CALDAS et al, 2005; HAILU et al, 2005; PERUHYPE-MAGALHÃES et al, 2006).

A evolução para forma clínica da doença e a disseminação do parasita para o baço, o fígado, os linfonodos e a medula óssea está intimamente relacionada à resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro (PERUHYPE-MAGALHÃES et al, 2005).

Apesar do grande avanço na compreensão dos aspectos imunológicos associados à leishmaniose, o papel das subpopulações celulares na resposta imune na LV humana ainda não está totalmente elucidado, necessitando-se de

mais estudos sobre a dinâmica e a imunorregulação das subpopulações celulares.

O presente trabalho propõe avaliar as características fenotípicas de diferentes subpopulações linfocitárias e de monócitos do sangue periférico de pacientes com LV, propõe demonstrar o complexo controle da produção de citocinas e a interação e modulação da resposta imune por essas subpopulações celulares. Essas informações podem ser importantes para abrir novas perspectivas na pesquisa em busca de novas opções terapêuticas e preventivas para os indivíduos com LV ou sob risco de adquirir a doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSES

O termo leishmaniose refere-se a uma série de doenças causadas pela *Leishmania* spp., protozoário da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* (JERONIMO; SOUSA; PEARSON, 2005). A *Leishmania* é encontrada em humanos na forma amastigota, imóvel, parasita intracelular obrigatório de macrófagos. As manifestações clínicas da leishmaniose variam, dependendo da espécie de *Leishmania* e de complexa interação entre invasividade, tropismo e patogenicidade do parasita e fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro. A forma de apresentação clínica pode ser dividida em três principais síndromes clínicas: a leishmaniose cutânea, a leishmaniose muco-cutânea e a LV (ou calazar). Todas as formas clínicas têm grande importância para o homem. A leishmaniose cutânea, a muco-cutânea e a LV podem promover, respectivamente, lesões cutâneas ulceradas; lesões mucosas frequentemente desfigurantes com destruição de membranas mucosas, principalmente nariz e boca e doença sistêmica com invasão do sistema retículo-endotelial, associada a aproximadamente 100% de mortalidade na apresentação clínica mais grave, se não tratada. As leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania* (PERSON; SOUSA, 1996). As espécies de flebotomíneos transmissores das leishmanioses, no Brasil, são do gênero *Lutzomyia*, encontradas em florestas e em áreas peridomicílio, as quais se reproduzem em matéria orgânica, quando em condições favoráveis de umidade e temperatura.

2.2 CICLO DE VIDA DA *LEISHMANIA* NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Durante o ciclo de vida a *L. donovani* apresenta duas formas distintas. No inseto vetor, o parasita apresenta a forma promastigota, caracterizada por um estágio extracelular, alongado e móvel. Nos vertebrados ele apresenta a forma amastigota, de aspecto arredondado, imóvel e intracelular obrigatória. A forma

promastigota metacíclica é inoculada na pele do hospedeiro pela picada do inseto vetor. Somente as fêmeas de flebotomíneos transmitem a doença, pela inoculação das formas promastigotas na pele do hospedeiro. A *Leishmania* é rapidamente internalizada por células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas da pele). A forma promastigota diferencia-se, então, na forma amastigota, após aproximadamente 12-24h da inoculação (SHARMA; SINGH, 2008). Dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos, a *Leishmania* é protegida da degradação pelo fagolisossomo por uma série de processos adaptativos que inibem os mecanismos de defesa do hospedeiro. Ocorrem inibição da fusão do fagolisossomo-endossomo, alterações nas vias de sinalização celular e alterações na produção de óxido nítrico e de citocinas (CUNNINGHAM, 2002). Os amastigotas se multiplicam de forma assexuada, por divisão binária, levando ao aumento importante do número de *Leishmanias* dentro dos macrófagos. Ocorre, então, o rompimento da célula infectada e, assim, a liberação das *Leishmanias* para infecção de outros macrófagos. Os macrófagos infectados podem permanecer na pele, como na leishmaniose cutânea, ou podem se disseminar para outros órgãos, como na LV (SHARMA; SINGH, 2008). Os parasitas disseminam-se pelo sistema linfático e vascular e infectam outros monócitos e macrófagos do sistema retículoendotelial, resultando em infiltração da medula óssea, em hepatoesplenomegalia e, algumas vezes, em linfadenomegalias.

2.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV é causada por espécies de protozoários do complexo *Leishmania donovani*, composto principalmente pela *L. (d) donovani*, *L. (d) infantum* e *L. (d) chagasi*. A *Leishmania donovani* é a principal causa da LV na Índia subcontinental, na Ásia e no leste da África. A *L. infantum* na região do Mediterrâneo e da Ásia central; e a *L. chagasi* nas Américas (GUERIN et al, 2002; DESJEUX, 2001; DESJEUX 2004). A leishmaniose é encontrada em 88 países, incluindo áreas tropicais, subtropicais e o sul da Europa, com mais de 12 milhões de indivíduos infectados e 350 milhões de pessoas vivendo nessas áreas. A LV ocorre em 65 países. Estima-se 500.000 novos casos de LV e mais de 50.000 mortes pela doença a cada ano no mundo

(DESJEUX, 2004). Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em apenas seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (CHAPPUIS et al. 2007). Nas Américas, a leishmaniose está presente do sul do Texas ao norte da Argentina (WEIGLE; SARAVIA, 1996). O Brasil concentra 90% dos casos descritos nas Américas.

Em algumas regiões, a infecção pode ser classificada como uma antroponose, como ocorre na Índia, em Bangladesh, em parte da China e em parte do Sudão. Nessas regiões, os flebótomos são antopofílicos e têm hábitos domésticos. Na região do Mediterrâneo e no Brasil, a LV se manifesta como zoonose de cães, eventualmente atingindo o homem. Os flebótomos têm hábitos variados, os quais sugam tanto o homem quanto o cão. Em algumas regiões da China e da África a doença se apresenta como zooantroponose (ROCHA, 2009).

Apesar de previamente descrita como doença rural, a incidência da LV tem crescido em áreas urbanas e periurbanas nos trópicos (DYE, 1996). Têm sido descritos, recentemente, surtos e epidemias de leishmaniose humana e canina em grandes cidades brasileiras (JERONIMO et al, 2004). A incidência da LV tem aumentado de forma significativa em cidades de várias regiões do país, como Boa Vista e Santarém na Região Norte; Teresina, São Luiz, Natal, Aracaju e Recife na Região Nordeste; Montes Claros, Belo Horizonte, Araçuaí e Sabará na Região Sudeste e Cuiabá e Campo Grande na Região Centro-Oeste (COSTA; PEREIRA; ARAUJO, 1990; ALVES; BEVILACQUA, 2004; DANTAS-TORRES, 2006). Essa mudança no perfil da leishmaniose pode ser explicada pela redução dos espaços e dos reservatórios naturais da doença e pelas condições epidemiológicas favoráveis (migrações, grandes aglomerados urbanos com precárias condições de infraestrutura e saneamento e grande número de animais nas proximidades dos domicílios), levando à nítida urbanização da doença em algumas regiões (ARIAS; MONTEIRO; ZICKER, 1996; GUERIN et al, 2002). As migrações, as falhas nas medidas de controle de disseminação da doença e a coinfeção LV – HIV são os três principais fatores que têm levado ao aumento da sua incidência no mundo (CHAPPUIS et al, 2007; DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004). Os cães se constituem como os principais reservatórios domésticos para a *L. infantum* e *L.*

chagasi e têm papel central no ciclo de transmissão para os homens (MORENO; ALVAR, 2002). Além dos cães domésticos, existem diversos reservatórios silvestres como raposas, gambás, tamanduás e outros.

Os dados do Ministério da Saúde do Brasil mostram aumento importante no número de casos de LV em Belo Horizonte e na região metropolitana. A taxa de incidência anual no Brasil se manteve relativamente estável se forem comparados os dados de 2001 e 2005: respectivamente 1,44 e 1,89 casos/100.000 habitantes. Na região metropolitana de Belo Horizonte, entretanto, essa incidência passou de 1,48 para 4,63 casos/100.000 habitantes, no mesmo período. Em Belo Horizonte, essa incidência variou de 1,37 para 4,72 casos/100.000 habitantes entre os anos de 2001 e 2005 (BRASIL, Ministério da Saúde, 2009). Tem sido observado, nos últimos anos, o aumento gradativo na letalidade da LV no Brasil, passando de 3,2% para 7,4% em 1994 e 2006, respectivamente (ROCHA, 2009).

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV caracteriza-se por amplo espectro clínico, da qual se observam as formas assintomática, subclínica e clássica (MURRAY et al, 2005). O desenvolvimento de manifestações clínicas depende de fatores relacionados à virulência do parasita e à resposta imunológica do hospedeiro. Nem todos os indivíduos infectados irão desenvolver a forma clínica da doença. A razão entre casos assintomáticos e clinicamente manifestos varia de 1:2,6 a 11:1 no Sudão (KHALIL et al, 2002); e de 8:1 a 18:1 no Brasil (BADARO et al, 1986b). A infecção assintomática ou inaparente ocorre na maioria dos indivíduos residentes em áreas endêmicas, é diagnosticada apenas por teste intradérmico (reação de Montenegro) e/ou métodos sorológicos. A forma subclínica, também frequente em áreas endêmicas, apresenta sintomatologia inespecífica, como febre baixa, retardo no crescimento, adinamia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia, porém, sem esplenomegalia. Em ambas as formas, a maioria dos casos, terá resolução espontânea ao final de alguns meses (GAMA et al, 2004; BADARO et al, 1986a). A forma clássica cursa, em geral, de modo arrastado. Os pacientes apresentam tipicamente febre, esplenomegalia, hepatomegalia, perda de peso e pancitopenia (OSMAN; KAGER;

OSKAM, 2000; MURRAY et al, 2005). Os pacientes podem apresentar também dor abdominal, diarreia, epistaxe, hiporexia, adinamia, caquexia, sudorese noturna e anorexia. Em exames laboratoriais não específicos para LV, anemia, leucopenia, trombocitopenia e hipergamaglobulinemia são frequentemente encontrados e característicos da LV. Os pacientes com LV clássica, se não tratados, podem evoluir com caquexia importante, hemorragias devido à trombocitopenia, suscetibilidade aumentada a infecções bacterianas devido a leucopenia e neutropenia e óbito, geralmente dentro de um a dois anos do início dos sintomas. A maior parte dos óbitos ocorre devido as complicações infecciosas ou sangramentos (NASCIMENTO; MEDEIROS, 2005; MURRAY et al, 2005). Pacientes, com condição imunossupressora de base (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, neoplasias hematológicas, transplantados e usuários de drogas imunossupressoras), apresentam manifestações clínicas geralmente semelhantes às dos imunocompetentes, porém, com recidivas mais frequentes pós-tratamento (FERNANDEZ-GUERRERO et al, 2004).

2.5 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O diagnóstico da LV é realizado, classicamente, pela observação direta, em exame de microscopia óptica, das formas amastigotas do parasita, seja em material de aspirado de medula óssea, de aspirado esplênico ou de aspirado de linfonodo, ou em exame anatomopatológico de peça de biópsia. A microscopia possui alta especificidade, entretanto, a sua sensibilidade é variável, apresentando-se em 93 a 99%, 53 a 86% e 53 a 65%, respectivamente para o aspirado esplênico, o aspirado de medula óssea e o aspirado de linfonodo (CHAPPUIS et al, 2007). O aspirado esplênico pode ter como complicação a hemorragia esplênica pós-procedimento, exigindo profissional treinado para sua punção e estrutura hospitalar para tratamento de possíveis complicações. Além disso, os resultados de exames microscópicos podem ser influenciados pela habilidade do profissional do laboratório que examinará o material.

Vários testes para pesquisa de anticorpos anti-leishmania têm sido desenvolvidos. Os testes sorológicos baseados em imunofluorescência indireta, ELISA e Western

Blot têm sido propostos, com alta acurácia no diagnóstico da LV. Os testes rápidos, para o diagnóstico sorológico, pela detecção de anticorpos contra leishmania do complexo *L. donovani* têm sido comercializados. O Kalazar Detect™ Rapid Test – InBios é um teste rápido de imunocromatografia em fita para a detecção de anticorpos anti-K39 para o diagnóstico da LV. O K39 é um antígeno protéico bem conservado dentro do complexo *L. donovani*. O teste utiliza o antígeno recombinante rK39 de *L. chagasi* e identifica a presença de imunoglobulina (IgG) anti-rK39 no plasma dos pacientes. O experimento apresenta sensibilidade de aproximadamente 93,9% e especificidade de aproximadamente 90,6% na maioria das áreas endêmicas para LV (CHAPPUIS et al, 2006; SUNDAR et al, 2006; CARVALHO, et al 2003; SUNDAR et al, 2002). O teste apresenta 98% de concordância, 90% de sensibilidade e 100% de especificidade quando comparado ao ensaio de imunofluorescência de anticorpos dos Centers for Disease Control and Prevention – CDC; Atlanta (WELCH, 2008). Os níveis de anticorpos séricos contra a *Leishmania* permanecem detectáveis por período de tempo ainda indeterminado, porém, longo. Os ensaios sorológicos, portanto, não fazem distinção entre doença ativa e passada, não auxiliando no diagnóstico de recidivas. Outra limitação é constituída pela proporção de indivíduos saudáveis vivendo em áreas endêmicas, que poderiam ter exames sorológicos positivos, porém, sem doença ativa (SUNDAR et al, 2006). O diagnóstico laboratorial da leishmaniose pode ser feito, também, pela cultura de material biológico, em meio específico para *Leishmania*, ou pela detecção de material genético da *Leishmania* por reação da cadeia da polimerase (PCR) ou hibridização, inclusive em sangue ou soro dos pacientes (MURRAY, 2005; MORENO et al, 2006). O diagnóstico da LV pode ser feito, portanto, pela associação da história clínica e epidemiológica e pela observação direta do parasita ou o exame sorológico positivo (BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2003).

A LV determina supressão reversível e específica da imunidade mediada por células. Observa-se, após a infecção, que os exames de pesquisa da imunidade celular ou humoral permanecem reativos por longo período. Isso requer a presença de antígenos, podendo-se concluir que a *Leishmania* ou alguns de seus

antígenos estão presentes no organismo durante longo tempo, após a infecção inicial. Indivíduos previamente infectados, após o desenvolvimento de alguma forma de imunossupressão, podem apresentar recidiva tardia da LV ou quadro clínico iniciado muito além do período de incubação tradicional, reforçando essa hipótese. Durante o período de manifestação clínica da doença, os pacientes exibem testes de imunidade humoral geralmente positivos (imunofluorescência, ELISA, Kalazar Detect™), que permanecem positivos por longo período. Os testes de imunidade celular (intradermorreação de Montenegro), entretanto, são geralmente negativos durante a doença ativa, e tornam-se positivos à medida que o indivíduo evolui à cura.

2.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE

Assim como em outras doenças infecciosas, o desenvolvimento da LV depende de fatores relacionados à virulência do parasita e à adequada resposta imune do hospedeiro. A resposta imune celular específica tem importante papel no controle da infecção, levando à ativação de macrófagos e resposta citotóxica e, conseqüentemente, à morte dos parasitas intracelulares.

2.6.1 O modelo experimental murino

O estudo de doenças em modelos experimentais, principalmente em camundongos, tem sido de grande auxílio na compreensão dos mecanismos imunológicos associados à evolução ou controle das doenças. Novas tecnologias têm sido desenvolvidas para o estudo nesses modelos. A experimentação, com camundongos “Knockout”, depletados de genes específicos, também, tem sido utilizada como ferramenta na compreensão de aspectos imunológicos específicos em infecções experimentais.

Na infecção experimental por *Leishmania major*, camundongos geneticamente resistentes a *Leishmania* desenvolvem resposta imune dominada pelo fenótipo de células T CD4⁺ auxiliares 1 (Th1), caracterizada pela secreção de IFN- γ . Em camundongos geneticamente susceptíveis, a resposta dominante é de fenótipo

Th2 (linfócitos T CD4⁺ auxiliares 2), caracterizada pela secreção de IL-4, interleucina 5 (IL-5) e interleucina 13 (IL-13). A resposta imune dicotômica e a evolução distinta da infecção nas diferentes linhagens de camundongos levaram ao conceito que o balanço entre resposta Th1 e Th2 determinaria a evolução da doença (ROBERTS, 2006; MATTEWS et al, 2000; ALMEIDA et al, 2003). A predisposição genética para susceptibilidade ou resistência a *L. major* em camundongos se relaciona à resposta Th2, guiada pela IL-4, ou à resposta dominante Th1, guiada pela IL-12 e IFN- γ , levando à evolução ou à cura da doença, respectivamente. Camundongos BALB/c são considerados susceptíveis e falham no controle da infecção, evoluindo com progressão da lesão por *L. major* e doença sistêmica. Esta linhagem é utilizada como modelo das formas clínicas de leishmaniose que não evoluem espontaneamente à cura, como a LV e a leishmaniose cutânea difusa, causadas pela infecção por outras espécies de *Leishmania*, como *L. chagasi* e *L. amazonensis* (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

A evolução da infecção por *L. major* na linhagem de camundongos BALB/c é progressiva e caracterizada pela síntese precoce de IL-4, na ausência de IL-12, e pela predisposição à resposta Th2. O papel da síntese precoce de IL-4 ao direcionar resposta Th2 é demonstrado em experimentos com camundongos BALB/c deficientes em IL-4 e com camundongos tratados com anticorpos anti-IL-4, os quais demonstram a melhora da infecção nestes animais. A produção da IL-4 guia a resposta imune para um padrão Th2 e suprime a resposta Th1, inibindo a secreção de IFN- γ necessário à ativação dos macrófagos infectados e consequente eliminação dos parasitas (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; ROBERTS, 2006).

A resposta imune à *Leishmania* é mais complexa, envolvendo outras citocinas, tal como a IL-12. A importância da IL-12 redirecionando a resposta Th2 é demonstrada por experimentos de depleção de IL-12, conduzindo ao aumento de IL-4 e estabelecimento de doença progressiva em camundongos naturalmente resistentes e por experimentos, com conversão de camundongos BALB/c (previamente susceptíveis) em camundongos resistentes, pelo tratamento com IL-

12 (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; ROBERTS, 2006). Estudos demonstram, também, exacerbação da doença e resposta Th2 sustentada em camundongos resistentes tratados com anticorpos anti-IL-12, porém, a infecção se tornava controlada se não mantido o tratamento, com os anticorpos anti-IL-12 (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

A resposta imune murina a *L. major* é influenciada por vários outros fatores, tais como o infiltrado inflamatório no local da infecção; a participação da IL-13, direcionando a resposta Th2 de forma semelhante à IL-4; e a participação de outras citocinas (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). O fator transformador de crescimento beta (TGF- β) constitui-se em importante citocina relacionada à resposta imune contra a *Leishmania*. O TGF- β apresenta função supressora da resposta Th 1 e inibidora da ativação de macrófagos. O papel do TGF- β foi demonstrado pela exacerbação da lesão em camundongos C57BL/6, tratados durante a fase crônica com TGF- β e por linhagens BALB/c, adquirindo resistência à infecção após tratamento com anticorpos anti-TGF- β . O tratamento com anticorpos anti-TGF- β não altera a produção de IL-4 ou IFN- γ , porém, está associada a aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos nas lesões (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

Camundongos BALB/c, infectados com *L. major* e tratados com anticorpos anti-IL-10, apresentam pouco efeito na reversão da progressão das lesões. Porém, estudos recentes utilizando modelos murinos com BALB/c e C57BL/6 deficientes em IL-10, infectados por *L. donovani*, mostraram o papel central da IL-10 no controle da LV. Na ausência da IL-10 essas linhagens de camundongos desenvolvem rapidamente resposta Th1 e, conseqüentemente, o controle efetivo da LV, sugerindo o papel crítico da IL-10 à progressão da doença (MURPHY et al, 2001; AWASTHI; MATHUR; SAHA; 2004). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, com funções reguladoras, produzida por linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais. É amplamente conhecido seu papel protetor nos tecidos, controlando o dano causado pela excessiva resposta inflamatória. A IL-10 é potente inibidor da ativação de macrófagos, inibindo a

morte dos amastigotas pela regulação negativa na produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e óxido nítrico (NYLÉN; SACKS, 2007).

A subpopulação de células “natural killer” (NK) representa componente adicional da imunidade inata associado à resposta Th1. As células NK têm grande habilidade em produzir IFN- γ , auxiliam também a produção de IL-12 pelas células dendríticas e a ativação dos linfócitos T. O controle precoce da infecção por *L. major* em camundongos C3H infectados está associado à resposta precoce das células NK. Camundongos C57BL/6 e BALB/c, os quais falham na resposta precoce de células NK, entretanto, têm atraso ou ausência de resposta Th1 e controle lento ou ausente da doença, respectivamente (SACKS; NOBENTRAUTH, 2002). Essas células, contudo, não são essenciais à resistência a *L. major*, pois camundongos com falhas específicas nas células NK produzem adequadamente IFN- γ dependente de IL-12 pelos linfócitos T CD4⁺ e cicatrizam suas lesões.

Os linfócitos T CD8⁺ parecem apresentar, também, múltiplas funções no modelo experimental da LV, tanto na atividade citotóxica contra células expressando antígenos de *Leishmania* quanto na produção de citocinas e quimiocinas (TSAGOZIS; KARAGOUNI; DOTSIKA, 2003; RUIZ; BECKER, 2007).

A ativação de macrófagos pelo IFN- γ e, conseqüentemente, a morte das amastigotas intracelulares está associada à indução da síntese de óxido nítrico. O TNF- α funciona como cofator estimulando a produção de óxido nítrico. Propõem-se também, como mecanismos de controle da infecção, a morte de macrófagos pelos linfócitos T citotóxicos e apoptose de macrófagos mediada por FasL (ROBERTS, 2006).

2.6.2 Aspectos imunológicos da leishmaniose visceral humana

Observam-se, na LV humana, grandes alterações imunológicas, manifestas pela profunda supressão da imunidade celular, pela ativação policlonal de células B,

levando a subsequente hipergamaglobulinemia e por elevados níveis de imunocomplexos circulantes (HAILU et al, 2005).

A LV está associada à supressão na produção de citocinas de padrão Th1, como IL-2, IFN- γ e IL-12. Concomitantemente, ocorrem aumento de produção de citocinas como IL-4 e IL-10, em linfócitos *in vitro* após estimulação com antígenos de *leishmania* (KHARAZMI, 1999; CARVALHO et al, 1985; BACELLAR et al, 2000). A inabilidade no controle da infecção pela *Leishmania* parece estar associada à não resposta das células T aos antígenos da *Leishmania* e à produção de IL-10. A IL-10 bloqueia a ativação Th1 e a resposta citotóxica pela regulação negativa na produção de IL-12 e IFN- γ . A IL-10 também inibe a ativação de macrófagos e a habilidade dessas células em matar a *Leishmania* (RIBEIRO-DE-JESUS et al, 1998). Células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com LV tratada, quando estimuladas com antígeno de *L. chagasi*, apresentam alto índice de proliferação. Neutralizantes de IL-12 e IL-10 recombinante, quando colocados em contato com tais células, diminuem o índice de proliferação e a produção de IFN- γ , processos os quais demonstram a importância da IL-12 e IL-10 na LV (BACELLAR et al, 2000).

À diferença do observado no modelo murino, a LV humana não apresenta padrão dicotomizado de resposta Th1/Th2. Alguns aspectos da resposta imune humana diferem da resposta murina, por exemplo, em humanos a IL-10 não é considerada citocina expressa apenas na resposta de células T Th2, o qual pode ser produzida por vários tipos de células T, tanto quanto por monócitos e macrófagos ativadas. (MOORE et al, 2001). Trabalhos mais recentes têm sugerido maior complexidade da resposta imune na LV humana, com correção de citocinas pró e anti-inflamatórias, e aumento sérico de IFN- γ e IL-10 em pacientes com doença ativa, quando comparados à população não infectada (CALDAS et al, 2005; PERUHYPE-MAGALHÃES et al, 2006).

Apesar dos pacientes com LV apresentarem níveis plasmáticos de IFN- γ e IL-10 mais elevados que os indivíduos saudáveis, pesquisadores descreveram profunda diminuição na produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes

com LV ativa, após estimulação, quando comparados antes e após tratamento da LV (HAILU et al, 2005; CALDAS et al, 2005). Porém, pacientes com LV assintomáticos (definidos por Hailu et al (2005), como indivíduos com teste cutâneo positivo para infecção por *L. infantum*, sem sinais ou sintomas de doença ativa) apresentam produção de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ semelhantes à população não infectada, sugerindo importante papel da supressão de resposta dessas subpopulações celulares para a evolução da doença (HAILU et al, 2005). A reduzida expressão de IFN- γ não parece ser defeito inerente à resposta antígeno-induzida Th1, pois, indivíduos pós-tratamento apresentam produção de IFN- γ antígeno-específico *in vitro* (NYLÉN; SACKS, 2004). O IFN- γ é amplamente aceito como importante estimulador da atividade anti-leishmania de macrófagos, porém, os níveis plasmáticos elevados durante a LV ativa, não são suficientes para o controle da infecção. Isso se deve, possivelmente, aos elevados níveis plasmáticos de IL-10, concomitantemente, encontrados nos pacientes com LV ativa (CALDAS et al, 2005), e à carência da produção do IFN- γ nos estágios iniciais da infecção (KHARAZMI, 1999). Em estudos experimentais de vacinas contra LV, a imunidade à doença tem se mostrado dependente tanto dos linfócitos T CD4⁺ quanto dos T CD8⁺, pois ambas subpopulações têm grande aumento na produção de IFN- γ , após estimulação vacinal (BHAUMIK; NASKAR; DE, 2009). Grande variedade de células podem responder a determinados estímulos com produção de IFN- γ , dentre elas os neutrófilos, as células dendríticas, as células NK e os linfócitos T do sistema imune (LIESE; SCHLEICHER; BORGDAN, 2008). Os interferons foram primeiramente reconhecidos pelo seu papel em infecções virais, mas agora existem evidências de sua participação na imunidade inata e adquirida para infecções bacterianas e parasitárias (LIESE; SCHLEICHER; BORGDAN, 2008). Na leishmaniose, a produção de IL-12 é de fundamental importância à indução da produção de IFN- γ , pelos linfócitos e células NK e reestabelecimento de resposta imune efetiva que levará ao controle do parasita (PERUHYPE-MAGALHÃES et al, 2005).

Pacientes com LV ativa apresentam elevados níveis séricos de IL-10 (KURKJIAN et al, 2006), e aumentada expressão de mRNA IL-10 nos tecidos (NYLÉN et al, 2007; NYLÉN; SACKS, 2004; ROBERTS, 2006). Em trabalhos realizados na

América do Sul e no Sudão, o tratamento com anticorpos anti-IL-10 consegue reverter a irresponsividade em relação à proliferação de células T e produção de IFN- γ em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LV. Estudos realizados em pacientes indianos, não encontraram os mesmos resultados, necessitando-se de mais estudos para que este assunto possa apresentar melhor definição (NYLEN; SACKS, 2004). A IL-10 suprime, também, múltiplas funções das células dendríticas e macrófagos, inibindo a maturação das células dendríticas por monócitos precursores e regulando negativamente o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II e moléculas coestimulatórias. A IL-10 promove a sobrevivência dos linfócitos T e, conseqüentemente, a ativação policlonal e a hipergamaglobulinemia estão associadas ao aumento na produção de IL-10. Apesar de útil para o diagnóstico da doença, a produção de anticorpos parece não ser benéfica para o paciente não auxiliando no controle da doença. Observa-se, também, autorreatividade com formação de imunocomplexos e desenvolvimento de vasculites e nefritis (RIZOS et al, 2005; KUMAR; DANESHBOD; SADEGHIPOOR, 2004; NYLEN; SACKS, 2004).

A evolução para forma clínica da doença, na LV, está intimamente relacionada à resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. A infecção sistêmica, com disseminação do parasita para o baço, o fígado, o linfonodo, a medula óssea e outros órgãos é acompanhada por altos títulos de anticorpos circulantes e diminuição da imunidade tipo 1 mediada por células T, com diminuição da produção de IFN- γ e IL-12 e aumento de IL-4 e IL-10 (PERUHYPE-MAGALHÃES et al, 2005).

Os linfócitos T CD4⁺ têm importante papel na produção de citocinas e são especializados na ativação de outras subpopulações celulares: células Th1, que ativam os macrófagos para eliminação dos microrganismos intracelulares neles contidos, e células Th2, que ativam a produção de anticorpos pelas células B. Os linfócitos T CD8⁺ apresentam função citotóxica, matando as células infectadas por microrganismos, e dessa forma, exercem importante papel no controle de algumas infecções. Apesar do grande avanço na compreensão dos aspectos

imunológicos associados à leishmaniose, o papel das subpopulações celulares na resposta imune na LV ainda não está totalmente elucidado.

O CD45 é uma molécula apresentada em diferentes isoformas no sistema imune. Em humanos, as células experientes, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺, expressam a isoforma CD45RO, podendo tornar-se células de memória. Em estudos recentes com pacientes com LV, pesquisadores observaram redução da expressão de CD45RO por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, do sangue periférico, em pacientes com LV ativa, retornando a nível semelhante aos da população não infectada após tratamento (CLARÊNCIO et al, 2009; HAILU et al, 2005). Observou-se, também, maior expressão de CD45RO em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na medula óssea que no sangue periférico, em pacientes com LV ativa, sugerindo migração seletiva dessas subpopulações celulares para o sítio da infecção e, possivelmente, participação ativa dessas células na resposta imune a LV (CLARÊNCIO et al, 2009).

As granzimas são proteases contidas em grânulos secretores das células T, sabidamente envolvidas na defesa contra infecções virais. A expressão de Granzima A está associada a múltiplas funções, tais como indução da morte celular, juntamente com Granzima B e perforina; remodelamento da matriz extracelular e modulação da migração de células T; ativação de monócitos e aumento da atividade fagocítica. No modelo experimental murino de leishmaniose cutânea por *L. major*, descreveu-se que a frequência de células T expressando Granzima A, na fase precoce da infecção, era maior em camundongos susceptíveis que em resistentes, entretanto, a produção de granzima A ou Granzima B não era crítica para o desenvolvimento de resposta T helper e resolução da doença (EISERT et al, 2002). Pouco se conhece sobre o papel da Granzima A, como marcador de citotoxicidade de linfócitos T CD8⁺, na leishmaniose visceral.

Os linfócitos T CD4⁺ podem produzir também interleucina 17 (IL-17). Essa citocina parece ter papel crítico na inflamação e na autoimunidade, contudo, pouco se conhece sobre a participação da IL-17 em infecções por protozoários. No curso

da infecção por *L. major*, linfócitos T CD4⁺ e neutrófilos de camundongos BALB/c, susceptíveis a *Leishmania*, produzem quantidades maiores de IL-17 que células de camundongos C57BL/6, resistentes a *L. major*. O tamanho e a progressão das lesões em camundongos BALB/c deficientes em IL-17 infectados é marcadamente menor que de camundongos controle. Pesquisadores observaram menor migração de neutrófilos nas lesões dos animais deficientes em IL-17 que nos camundongos controle (LOPEZ KOSTKA et al, 2009). Linfócitos de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa produzem níveis mais altos de IL-17 que a população não infectada. Demonstraram-se, também, tendência a maior expressão de IL-17 nas células das lesões mucosas que nas lesões cutâneas, e correlação entre produção de IL-17 e inflamação celular local (BACELLAR et al, 2009).

Em adição as clássicas células T CD4⁺ e T CD8⁺, existe uma população minoritária de células T que não expressa nem CD4, nem CD8, chamada de células T duplo negativas (T CD4⁻CD8⁻ (DN)), encontradas no sangue periférico, timo e pele. Dentro dessa população pode-se encontrar subpopulações que expressam receptor de células T (TCR) $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. As células que expressam TCR $\alpha\beta$ têm natureza regulatória negativa, e estão associadas a desordens autoimunes graves. A subpopulação DN, especialmente $\alpha\beta$, parece ser uma população de células T altamente ativada, produzindo citocinas relevantes para ativação de monócitos e macrófagos. Em indivíduos não infectados aproximadamente 80% das células T duplo negativas expressa TCR $\gamma\delta$ (GOLLOB et al, 2008). Na leishmaniose cutânea, apesar de pouco frequente quando comparada com outras subpopulações de células T, as células T DN expressam hiperativação, com aumentada expressão de CD69 e HLA-DR, e aumentada produção de IFN- γ e TNF- α , sugerindo importante papel na imunidade inata em resposta à *Leishmania*. Ao contrário de pacientes não infectados a maior parte da população de células T CD4⁻CD8⁻ (DN) expressa TCR $\alpha\beta$ (~72%)(ANTONELLI et al, 2006). Ambas subpopulações $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, expressam maiores frequências de IFN- γ , TNF- α e IL-10. A subpopulação $\alpha\beta$ apresenta maior frequência de produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , tanto em meio quanto após estimulação

antígeno-específica, enquanto a subpopulação $\gamma\beta$ produz mais IL-10, com função anti-inflamatória/reguladora (ANTONELLI et al, 2006). Pouco se conhece sobre o papel dos linfócitos T CD4⁻CD8⁻ (DN) na leishmaniose visceral, porém, é descrito alta frequência de produção de IFN- γ e TNF- α , assim como de IL-10 em linfócitos T CD4⁻CD8⁻ (DN) de um paciente com LV, sugerindo papel modulatório dessas células na LV (LAGLER et al 2003).

Muitos outros aspectos da resposta imunológica na LV humana, ainda não foram elucidados, necessitando-se de estudos mais aprofundados sobre a dinâmica e a imunorregulação das subpopulações celulares e suas moléculas para maior conhecimento da doença e possibilidade de novas perspectivas à prevenção e o tratamento dos pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotípica e funcionalmente as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e duplo negativos CD4⁺CD8⁻ do sangue periférico, determinando sua capacidade citotóxica e a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, e a frequência de monócitos CD14⁺ produtores de citocinas em pacientes com LV pré e pós-tratamento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Em relação aos linfócitos T CD4⁺:

- Analisar a frequência de linfócitos T CD4⁺ isolados do sangue periférico de pacientes com LV expressando a molécula de experiência/memória CD45RO, como também avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-17) e anti-inflamatória (IL-10), antes e após o estímulo, com SLA;
- Determinar a frequência de linfócitos T CD4⁺ isolados do sangue periférico de pacientes com LV, expressando a molécula de experiência/memória CD45RO, como também avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-17) e anti-inflamatória (IL-10), comparando pré e pós-tratamento específico da doença;
- Estudar a expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α , assim como da citocina anti-inflamatória IL-10 em linfócitos T CD4⁺ expressando ou não a molécula coestimuladora CD28 estimuladas ou não com SLA, tanto antes quanto após o tratamento dos pacientes com LV;

- Avaliar a existência de correlação entre a expressão de moléculas de experiência/memória, e a produção de citocinas nos linfócitos T CD4⁺, de pacientes com LV estimulados ou não com SLA, pré e pós-tratamento específico da doença.

- Em relação aos linfócitos T CD8⁺:

- Analisar a frequência de linfócitos T CD8⁺ isolados do sangue periférico de pacientes com LV expressando a molécula de experiência/memória CD45RO, como também avaliar a sua capacidade citotóxica pela expressão de Granzima A e avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10), antes e após o estímulo com SLA;
- Determinar a frequência de linfócitos T CD8⁺ isolados do sangue periférico de pacientes com LV, expressando a molécula de experiência/memória CD45RO e a molécula citotóxica Granzima A, como também avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10), comparando pré e pós-tratamento específico da doença;
- Correlacionar a expressão de moléculas de experiência/memória, a expressão de citotoxicidade e a produção de citocinas nos linfócitos T CD8⁺ de pacientes com LV estimulados ou não com SLA, pré e pós-tratamento específico da doença.

- Em relação aos linfócitos T duplo negativos CD4⁻CD8⁻:

- Analisar a frequência de linfócitos T duplo negativos CD4⁻CD8⁻ (DN) expressando o TCR $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, antes e após estímulo com SLA.

- Em relação aos monócitos:

- Determinar a frequência de monócitos CD14⁺, estimulados ou não com SLA, expressando citocinas como o TNF- α e IL-10 em pacientes com LV pré e pós-tratamento específico;
- Correlacionar a frequência de monócitos produtores de TNF- α e IL-10 estimulados ou não com SLA, em pacientes com LV, pré e pós-tratamento específico da doença.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Foram incluídos no estudo oito pacientes de ambos os sexos, sem restrição de idade ou cor de pele, com diagnóstico de leishmaniose visceral clinicamente manifesta, internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) ou no Hospital Infantil João Paulo II da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG). Foram estudadas as células do sangue periférico desses pacientes antes do início e após o término do tratamento específico. Dentre os oito pacientes que iniciaram o estudo um faleceu antes do término do tratamento devido a complicações infecciosas da leishmaniose (choque séptico), um paciente não retornou após o término do tratamento para acompanhamento clínico e coleta da amostra de sangue após o tratamento, e um responsável por paciente menor de idade não autorizou a coleta de sangue na consulta de acompanhamento após o término do tratamento.

4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com quadro clínico e epidemiológico compatíveis com LV, antes do início do tratamento específico, e com diagnóstico confirmado por observação direta do parasita em aspirado de medula óssea ou teste sorológico positivo para infecção por *Leishmania* do complexo *Leishmania donovani*, excluídos outros diagnósticos.

4.1.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com LV que já haviam iniciado tratamento específico ou com passado de LV tratada;
- Pacientes com doenças imunossupressoras (AIDS, transplantados, doenças onco-hematológicas, *diabetes mellitus*, insuficiência renal crônica);

- Pacientes em uso de drogas imunomoduladoras.

4.1.3 Caracterização dos pacientes

Foram incluídos na pesquisa oito pacientes, dois (25%) do sexo masculino e seis (75%) do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de cinco meses a 42 anos, com média de aproximadamente 12 anos e mediana de 5 anos. O diagnóstico da LV foi realizado com exame sorológico em seis pacientes (75%). Dois pacientes tiveram mielograma realizado, o qual foi positivo para *Leishmania* em ambos os pacientes. O tempo de início dos sintomas variou de 20 a 360 dias, com média de 72 dias e mediana de 30 dias. O primeiro sintoma da maioria dos pacientes foi a presença de febre (62,5%). Todos os pacientes apresentaram febre, adinamia, hepatomegalia e esplenomegalia. A hiporexia, dor abdominal, diarreia e epistaxe estavam presentes em 87,5; 37,5; 25 e 25% dos pacientes, respectivamente. Todos os pacientes apresentavam anemia, com hemoglobina variando de 4,3g/dL a 7,9g/dL, e média de 6,48g/dL. O número de leucócitos variou de 1.200/mm³ a 5.420/mm³, com média de 2.721/mm³. A frequência de linfócitos variou de 35 a 77%. O número de monócitos variou de 1 a 19%. A dosagem de plaquetas variou de 11.000/mm³ a 158.000/mm³, com média de 84.625/mm³ (tabela 4.1).

Tabela 4.1: Características demográficas, tempo de início dos sintomas e características laboratoriais dos pacientes com leishmaniose visceral pré-tratamento

PACIENTE	SEXO	IDADE	TEMPO INÍCIO SINTOMAS (dias)	Hb g/dL	LEUCOCITOS /mm ³	LINFOCITOS %	LINFÓCITOS /mm ³	MONÓCITOS %	MONÓCITOS /mm ³	PLAQUETAS /mm ³
1	M	5 meses	37	5,8	2.400	46%	1.104	4%	96	11.000
2	F	4 anos	20	7,3	5.420	59%	3.198	4%	217	91.000
3	F	27 anos	360	5,6	1.200	41%	493	19%	233	104.000
4	F	1 ano	20	4,3	2.300	77%	1.771	1%	23	40.000
5	F	6 anos	30	7,9	4.700	60%	2.820	8%	376	137.000
6	F	4 anos	30	6,5	2.100	35%	735	2%	42	158.000
7	F	11 anos	20	7,0	1.700	50%	850	9%	153	78.000
8	M	42 anos	60	7,4	1.950	54%	1.053	4%	78	58.000

4.1.4 Tamanho da amostra

Foi realizado cálculo estatístico para a definição do tamanho da amostra baseado em dados da literatura sobre produção sérica de citocinas na LV e utilizando programa estatístico específico, sugerindo um número de oito pacientes para o estudo.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 História clínica e exame físico

Todos os pacientes foram submetidos à anamnese e exame clínico pelo autor da pesquisa. Durante a entrevista os pacientes e/ou seus responsáveis legais expressaram espontaneamente suas queixas e se questionou sobre o tempo de início dos sintomas, o sintoma inicial e demais sintomas, o contato prévio com cães sabidamente doentes ou suspeitos e sobre os possíveis critérios de exclusão. Verificavam-se, em prontuário, os dados para confirmação dos critérios de inclusão. Convidavam-se os pacientes e/ou seus responsáveis legais para participar voluntariamente do estudo. Anotavam-se, em formulário próprio da pesquisa, os dados demográficos, clínicos e laboratoriais para caracterização da população de pacientes em estudo (APÊNDICE A).

4.2.2 Exames laboratoriais diagnósticos

Os exames complementares para confirmação da LV foram realizados na rotina habitual. Não se realizou mielograma exclusivamente devido ao estudo.

O diagnóstico sorológico foi realizado pelo teste rápido para detecção de anticorpos contra *leishmania* do complexo *L. donovani* (Kalazar Detect™ Rapid Test – InBios). O Kalazar Detect™ Rapid Test – InBios é um teste rápido de imunocromatografia em fita para a detecção de anticorpos anti-K39, para diagnóstico da LV. O teste utiliza o antígeno recombinante rK39 de *L. chagasi* e identifica a presença de imunoglobulina (IgG) anti-rK39 no plasma dos pacientes.

O teste apresenta 98% de concordância, 90% de sensibilidade e 100% de especificidade quando comparado ao ensaio de imunofluorescência de anticorpos dos CDC (WELCH, 2008).

Realizava-se punção venosa de todos os pacientes para a coleta de alíquota de sangue (6 mL), para a pesquisa antes do tratamento e após o término do tratamento (40 dias após o início do tratamento). Depois da coleta, as amostras de sangue eram encaminhadas imediatamente para processamento no Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LBIC/ ICB/UFMG, Dra. Walderez Ornelas Dutra).

4.2.3 Obtenção do antígeno solúvel de *Leishmania*

O antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) de *L. chagasi* foi preparado no Laboratório de Biologia das Interações Celulares. A preparação antigênica foi mantida a -80°C até a sua utilização.

Obteve-se uma alíquota do segundo repique da cultura de *L. chagasi* BH 46 (Departamento de Parasitologia/ICB/UFMG/Brasil, Dra. Maria Norma Melo). Após o segundo repique da cultura no nosso laboratório os parasitas apresentavam-se com perfil homogêneo, predominando a forma promastigota metacíclica. As *L. chagasi* foram lavadas e ajustadas na concentração de 10^8 promastigotas/mL em PBS seguidos por 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C . Em seguida realizavam-se três ciclos de ultrasonicação a 40 hertz, por 30 segundos cada ciclo, com intervalo de um minuto entre os ciclos. Após a sonicação checava-se em microscópio óptico a lise dos parasitas. Centrifugava-se a 1.4000rpm por 30 minutos a 4°C , e, em seguida, coletava-se e filtrava-se o sobrenadante em filtro de milipore $0,45\mu\text{m}$. Posteriormente a filtração em milipore, a concentração de proteína foi medida pelo método do ácido bicinônico (BCA). O antígeno foi titulado usando células mononucleares de sangue periférico de um paciente com passado de LV tratado.

4.2.4 Congelamento das células do sangue periférico

Cada amostra de sangue total (6 mL) foi coletada em frasco heparinizado e distribuída em três frascos. Ao primeiro frasco acrescentou-se SLA para a concentração de 15 μ g/mL (250 μ l), ao segundo 250 μ L de meio e ao terceiro estímulo policlonal com aCD3aCD28 (250 μ L). As amostras foram incubadas em estufa com CO₂ por duas horas, sendo a seguir acrescentado 2 μ L de brefeldina A e reincubadas por mais quatro horas em estufa com CO₂. A brefeldina A “desorganiza” a estrutura do complexo de Golgi impedindo a exportação de proteínas para o meio extracelular. As amostras foram centrifugadas após a incubação a 4°C, 1.200 rpm por 10 minutos. O soro foi separado, e as células foram suspensas por agitação, sendo adicionado quatro vezes o volume inicial de PBS. As amostras foram novamente centrifugadas a 4°C, 1.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células suspensas por agitação e reconstituídas para 2mL com PBS. Foram, a seguir, adicionados 20 volumes de Lyse/Fix® 1x. As amostras foram, a seguir, incubadas em gelo por 30 minutos. Estas foram novamente centrifugadas a 4°C, 1.200 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células suspensas por agitação, reconstituídas para 2mL de PBS e congelada a -70°C.

4.2.5 Descongelamento das células

As células foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Em seguida, transferidas para tubos Falcon® de 15mL, lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas a 4°C a 1.200 rpm por 10 minutos. O volume foi concluído com q.s.p. para 220 μ L com PBS. As amostras eram, então, plaqueadas em placas de 96 poços (20 μ L/poço).

4.2.6 Imunofluorescência para análise de linfócitos e monócitos do sangue periférico, de moléculas de superfície, citotoxicidade e citocinas

Foi utilizada placa estéril de 96 poços, adicionados 20 μ l da suspensão de células em cada poço. Em seguida, foram adicionados os anticorpos anti marcadores de superfície, já diluídos, conforme titulação anteriormente padronizada no nosso laboratório, num volume final de 20 μ l. Utilizou-se um conjunto de três anticorpos marcados com diferentes fluorocromos. Para marcadores de superfície foram utilizados anticorpos anti-TCR $\alpha\beta$ FITC, anti-TCR $\gamma\delta$ FITC, anti-CD45RO PE, anti-CD28 PE, anti-CD14 FITC, anti-CD4 PECy5 e anti-CD8 PECy5.

Após adição dos anticorpos, a placa era incubada a 4°C por 15 minutos ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, procedia-se à lavagem das células adicionando 150 μ l de PBS gelado em cada poço. A placa era, então, centrifugada durante 10 minutos a 4°C, 1.200 rpm. Ao final da centrifugação, vertia-se a placa para retirar o sobrenadante e, posteriormente, a placa era agitada a fim de suspender as células. De posse das células já suspensas, adicionou-se, finalmente, 100 μ l de PBS e 100 μ l de solução de formaldeído 4%. Após adição da solução de formaldeído, as células foram deixadas em fixação por 20 minutos à temperatura ambiente.

Após remover a solução de fixação por centrifugação e lavar as células com 150 μ l de PBS, seguia-se a permeabilização celular, incubando as células por 10 minutos com solução de saponina 0,5% à temperatura ambiente. Ao final do período de incubação, a placa era centrifugada por 10 minutos a 4°C, 1.200 rpm. O sobrenadante foi desprezado e a placa agitada. Foram adicionados, a seguir, sobre as células, 40 μ l da solução de anticorpos anti-citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10) e anti-granzima A marcados com o fluorocromo PE, adequadamente diluídos em solução de saponina 0,5%. As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. As células, após este período, foram lavadas por centrifugação adicionando, a cada poço, 150 μ l da solução de saponina. Esta operação foi repetida duas vezes sendo a última lavada utilizando PBS azida. Após desprezar o sobrenadante e agitar a placa, as células foram, finalmente, diluídas em 100 μ l de PBS e 100 μ l de solução de formaldeído 4%. O volume final de 200 μ l de solução, contendo as células marcadas, foi transferido para tubos

próprios para leitura no citômetro de fluxo. As células foram mantidas a 4°C, ao abrigo da luz para que as fluorescências não fossem perdidas até a leitura no citômetro, o que acontecia, no máximo dentro de um dia.

4.2.7 Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi criada na década de 70 com o objetivo de separar e/ou analisar linfócitos B e T, e dessa forma se conhecer mais profundamente a biologia dessas células. Atualmente, é utilizada com este objetivo tanto pela análise fenotípica destas células pela expressão de suas moléculas de superfície, e/ou por suas características funcionais, analisando a produção de moléculas intracitoplasmáticas, como as citocinas, quanto para a análise de outros tipos celulares e as moléculas por elas expressas.

As preparações celulares marcadas com os anticorpos monoclonais fluorescentes foram avaliadas em citômetro de fluxo - FACSCAN (Becton & Dickinson), imediatamente, após a coloração, já descrita. Durante a aquisição dos dados foram coletados pelo menos 50.000 eventos em cada tubo de leitura.

Os dados foram analisados utilizando o programa de computador Flowjo. A primeira etapa do processo de análise consistiu na determinação da população celular de interesse. Essa determinação foi baseada no perfil de tamanho e granulosidade das populações celulares adquiridas e na expressão de marcadores fenotípicos (figura 4.1).

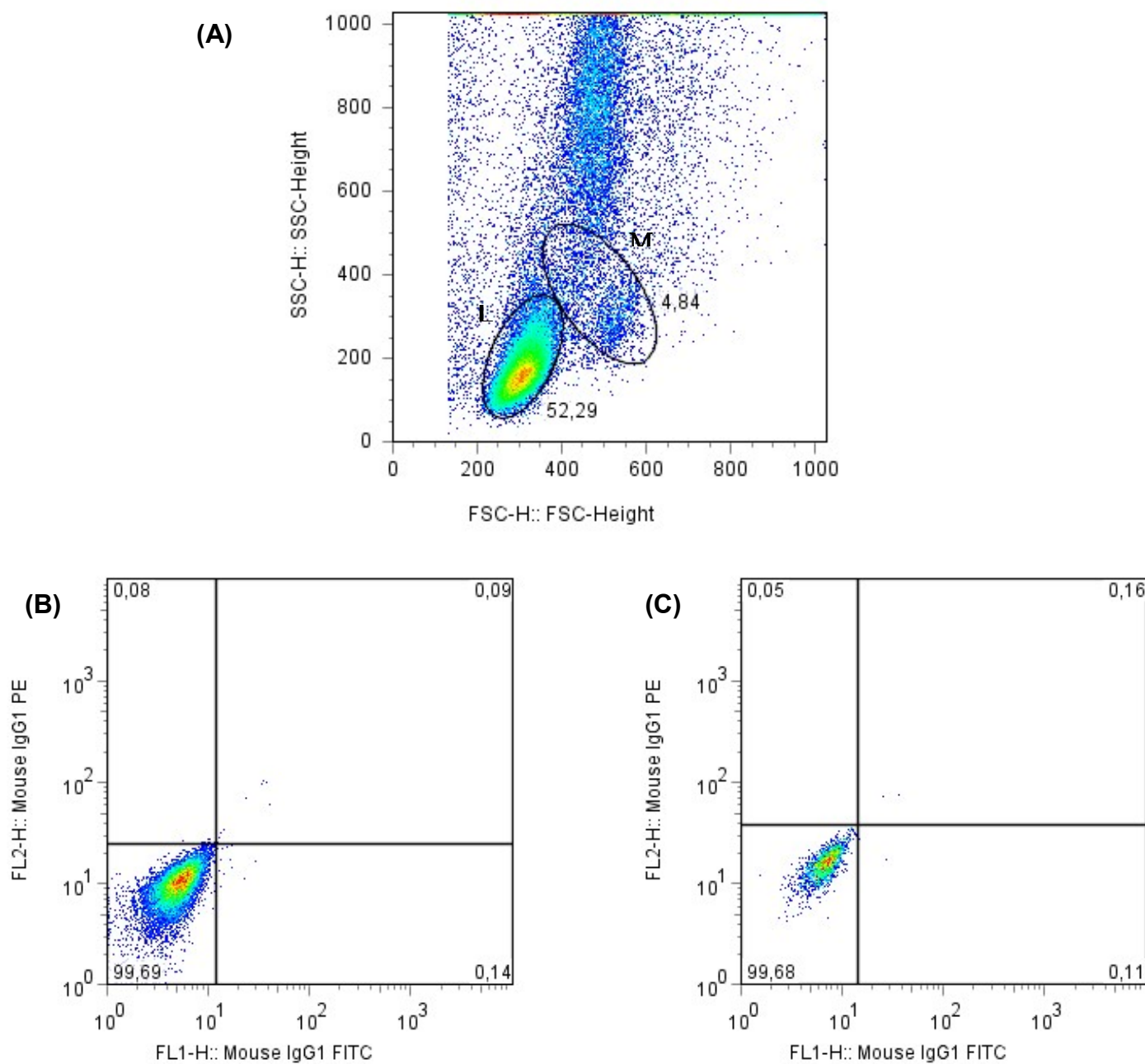


Figura 4.1: Perfil da distribuição de células do sangue periférico no gráfico de tamanho versus granulosidade (A) e controle de isotipo de linfócitos (B) e monócitos (C). As células do sangue periférico foram obtidas conforme descrito. No gráfico A, delimitou-se a região de linfócitos totais (L) e a região de monócitos (M), baseada em conhecimento prévio do posicionamento destas populações células no gráfico de tamanho x granulosidade, de acordo com as sub-populações de interesse em diferentes situações de análise. Os gráficos B e C mostram a distribuição representativa em “dot-plot” obtida pela marcação de células do sangue periférico com anticorpos monoclonais não relacionados marcados com FITC e PE (controles isotípicos) de linfócitos totais (B) e monócitos (C).

Após a definição das populações celulares de interesse procederam-se às análises de fluorescência. Para tal, montaram-se gráficos pontuais de fluorescência. Definiu-se a delimitação dos quadrantes a partir do posicionamento de células marcadas com os controles de isotipo (imunoglobulina de camundongo do mesmo isotipo dos anticorpos utilizados nas marcações para as análises de fluorescência, conjugados com FITC e PE). Nas marcações dos isotipos, posicionaram-se os quadrantes de forma que, no mínimo 95 a 99 % das células se encontrassem no quadrante inferior esquerdo. A partir do posicionamento das células nesses gráficos, foi possível determinar a frequência de células simples-positivas, presentes nos quadrantes superior esquerdo (UL) e inferior direito (LR); a frequência de células duplo-positivas, presentes no quadrante superior direito (UR), e a frequência de células negativas, posicionadas no quadrante inferior esquerdo (LL). Definido o posicionamento dos quadrantes, o Flowjo forneceu uma análise estatística dos dados, baseada na porcentagem ou no número absoluto de células posicionadas em cada quadrante, dentro das regiões definidas, como ressaltado na figura 4.2.

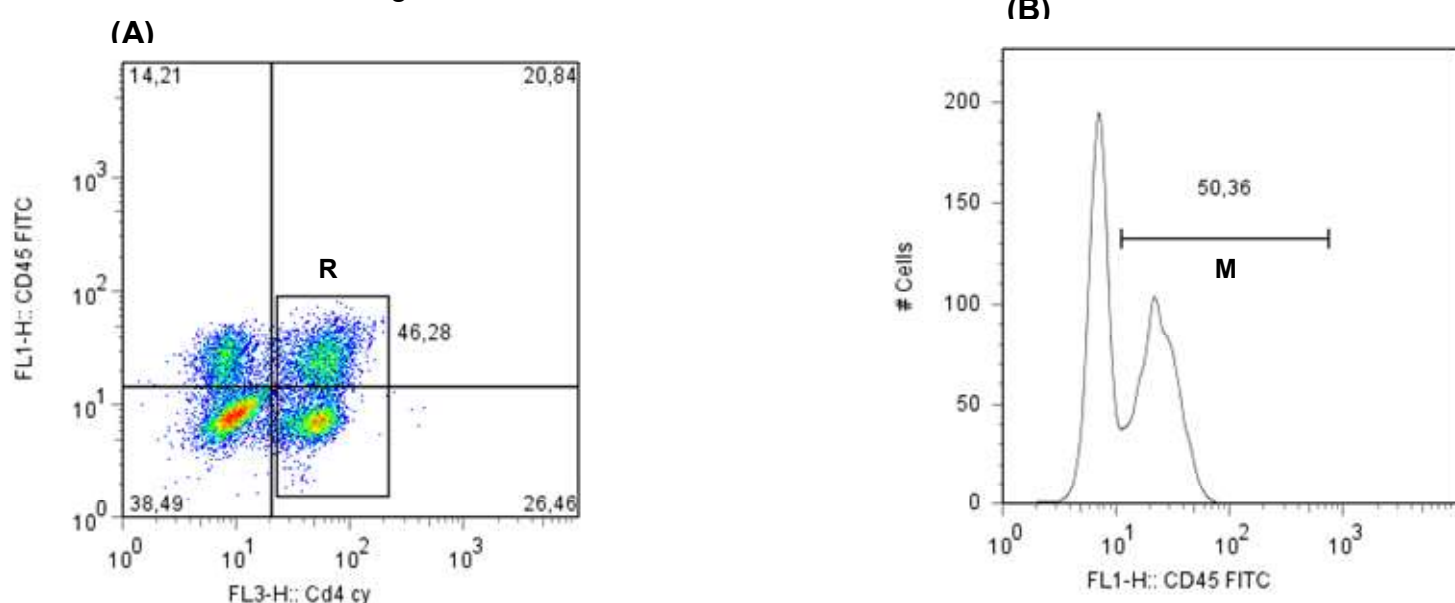


Figura 4.2: “Dot plot” e histograma representativos dos linfócitos T CD4⁺ totais e da expressão de CD45RO dentro dessa subpopulação.

A – Perfil pontual representativo de linfócitos do sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral marcadas com anticorpos anti-CD45RO PE e anti-CD4 PECy5.

B – Histograma ilustrativo referente à fluorescência observada para CD45RO dentro da janela R, onde M representa a frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RO.

A partir dos dados obtidos nas análises de citometria de fluxo, uma gama de informações sobre as populações celulares pode ser obtida.

4.2.8 Análises estatísticas

Os resultados, obtidos conforme descrito, foram expressos na forma de gráficos e tabelas, apresentando-se a média +/- desvio padrão. A análise comparativa entre células do sangue periférico de pacientes com LV antes do estímulo (MEIO) e após o estímulo com SLA, foi realizada por intermédio do teste t pareado quando os resultados obedeceram a uma distribuição normal, ou Wilcoxon pareado, quando os resultados não apresentaram distribuição normal, utilizando o programa estatístico JMP para a distribuição das variáveis e o programa estatístico Graphpad para os testes estatísticos. A análise comparativa entre células do sangue periférico de pacientes com LV pré e pós-tratamento, requereu o teste t do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Foram também realizadas análises de correlação entre as citocinas e as subpopulações celulares, utilizando o programa estatístico JMP. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os pacientes e/ou seus responsáveis legais com o diagnóstico de leishmaniose visceral internados no Hospital das Clínicas da UFMG e no Hospital infantil João Paulo II da FHEMIG durante o período do estudo que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar da pesquisa. Os objetivos, o procedimento da punção venosa para coleta de sangue e os riscos da coleta de sangue foram explicados aos pacientes e /ou aos seus responsáveis legais. O autor lia o Termo de Consentimento Esclarecido (APÊNDICES B à F), esclarecia as dúvidas e entregava uma via do termo de consentimento ao paciente ou ao seu responsável legal. Informava-se aos pacientes que a participação ou não no estudo não interferiria na atenção à saúde que vinha sendo prestada a ele. Informava-se também que poderiam obter informações ou esclarecimentos ao longo da

pesquisa e cancelar seu consentimento de participação ou abandonar o estudo a qualquer momento. Os pacientes foram informados que os resultados da pesquisa seriam apresentados à comunidade científica, sem a identificação individual dos pacientes. O projeto foi aprovado pelo Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG (ANEXO A), pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG (ANEXO B), pela Unidade Funcional Pronto Atendimento do Hospital das Clínicas da UFMG (ANEXO C), pelo Colegiado da Unidade Funcional Pediatria do Hospital das Clínicas da UFMG (ANEXO D), pela Comissão de Pesquisa da Unidade Funcional Clínica Médica do Hospital das Clínicas da UFMG (ANEXO E), pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMIG (ANEXO F) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (ANEXO G).

5 RESULTADOS

Os resultados, obtidos da aquisição na citometria de fluxo, relativos à expressão de CD45RO, à expressão de Granzima A, à produção de IFN- γ , TNF- α , IL-17 e a IL-10 foram comparados nas subpopulações celulares antes e após estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) e pré e pós-tratamento específico da LV.

5.1 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADOR DE MEMÓRIA E PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL ANTES E APÓS ESTIMULAÇÃO COM SLA

5.1.1 Comparação da frequência de subpopulações de linfócitos T expressando CD45RO nos pacientes com Leishmaniose Visceral antes e após estímulo com SLA

O CD45 é uma importante molécula no sistema imune e apresenta diferentes isoformas. A expressão destas diferentes isoformas é dependente do estado de diferenciação das células e de sua ativação. Em humanos, as células experientes expressam a isoforma CD45RO, podendo tornar-se células de memória. Dessa forma, analisou-se a frequência de expressão do marcador de experiência/memória CD45RO em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺.

5.1.1.1 Análise da frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ expressando CD45RO de pacientes com Leishmaniose Visceral, pré-tratamento específico, antes e após estímulo com SLA

Não houve alteração significativa na frequência média de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RO de pacientes pré-tratamento para LV, quando comparadas antes (29,20% +/- 15,60%) e após (26,29% +/- 13,43%) estímulo com SLA.

Também não foi observada diferença significativa na média de frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO, em pacientes pré-tratamento para LV, quando comparada antes (34,83% +/- 15,21%) e após (33,90% +/- 14,63%) estímulo com SLA.

5.1.1.2 SLA induz aumento na média de frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO de pacientes pós-tratamento para Leishmaniose Visceral

Conforme apresentado na figura 5.1, houve aumento significativo ao se comparar a média da frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO, de pacientes pós-tratamento para LV, antes (10,28% +/- 6,30%) e após (21,27% +/- 9,34%) estímulo com SLA. Portanto, após a cura da infecção, observa-se que o estímulo antígeno específico é capaz de estimular a expressão de experiência/memória em linfócitos T CD8⁺.

Nos linfócitos T CD4⁺ de pacientes tratados para LV, não houve variação significativa ao se comparar a frequência média de células expressando CD45RO antes (24,58% +/- 13,71%) e após (32,80% +/- 12,26%) o estímulo com SLA. Apesar dessa diferença não ter ocorrido nessa subpopulação, observa-se tendência de aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RO antígeno-específico pós-tratamento.

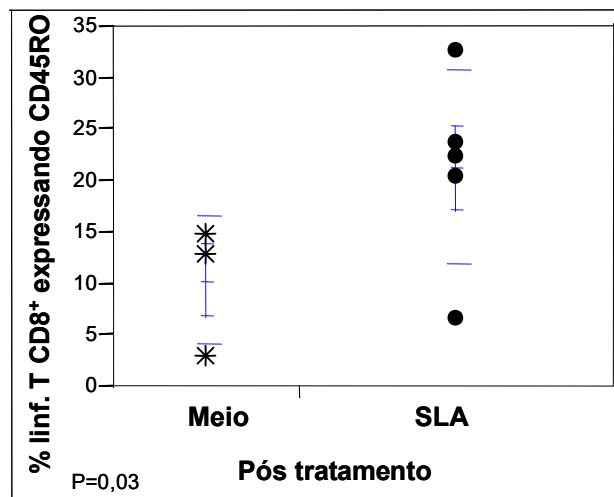


Figura 5.1: Comparação da média de frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO em pacientes tratados para LV antes e após estímulo antígeno específico. Células do sangue periférico de pacientes tratados para LV (N=5) foram mantidas em cultura sem estímulo (meio) ou estimuladas com 15 µg/mL de SLA. Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-CD45RO PE e anti-CD8 PECy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t pareado para variáveis com distribuição normal e Wilcoxon para variáveis de distribuição não normal. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5.1.2 Comparação da frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando Granzima A e produzindo citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10 em pacientes com Leishmaniose Visceral antes e após estímulo com SLA

Os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ podem produzir uma série de citocinas durante a resposta imune. Entre as citocinas produzidas pelos linfócitos T, foram estudadas a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-17) e anti-inflamatórias (IL-10) em pacientes com LV pré e pós-tratamento, antes e após estímulo dos linfócitos com SLA. Foi também analisada a capacidade citotóxica da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ pela expressão de Granzima A.

5.1.2.1 Análise da média de frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de Granzima A, IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10 em pacientes com Leishmaniose Visceral pré-tratamento específico, antes e após estímulo com SLA

Ao ser analisada a expressão de IFN- γ nas sub-populações linfocitárias, observou-se aumento estatisticamente significativo na média de frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ em pacientes com LV no início dos sintomas, ou seja, antes do tratamento específico, após estímulo com SLA (figura 5.2) (tabela 5.1). Não houve, entretanto, variação significativa da média de frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de TNF- α , IL-17 ou IL-10 em pacientes com LV, antes do tratamento da leishmaniose, comparando-se antes e após a estimulação com SLA (tabela 5.1).

Ao ser analisada a média de frequência de linfócitos T CD8⁺ produzindo Granzima A, IFN- γ , TNF- α , ou IL-10, em pacientes com LV pré-tratamento, não se observou diferença estatisticamente significativa, comparando antes e após estímulo com SLA (tabela 5.2).

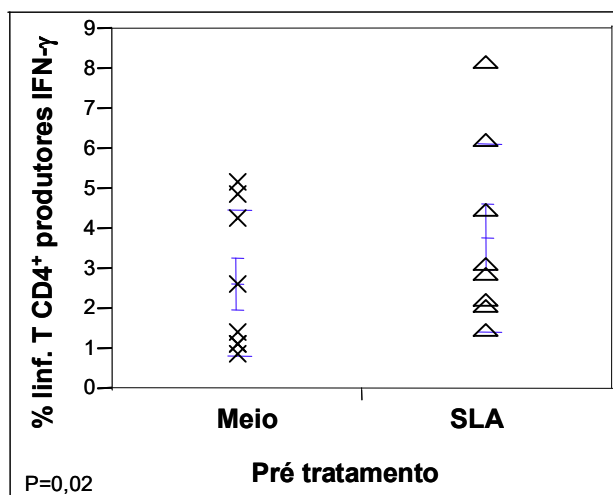


Figura 5.2: Comparação da média de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ em pacientes com LV pré-tratamento específico, antes e após estímulo antígeno específico. As células do sangue periférico de pacientes com LV pré-tratamento (N=8) foram mantidas em cultura sem estímulo (meio) ou estimuladas com 15 μ g/mL de SLA. Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-IFN- γ PE e anti-CD4 PECy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t pareado para variáveis com distribuição normal e Wilcoxon para variáveis de distribuição não normal. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Tabela 5.1 – Porcentagem média de linfócitos T CD4⁺ expressando IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10 de pacientes com LV, pré e pós-tratamento, antes e após estímulo com SLA.

CD4		IFN- γ * † ‡	TNF- α	IL-17 †	IL-10
Pré-tratamento	Meio	2,64 ± 1,83	2,42 ± 1,24	5,13 ± 2,63	2,12 ± 1,72
	SLA	3,78 ± 2,33	3,77 ± 2,18	4,91 ± 2,61	2,89 ± 1,62
Pós-tratamento	Meio	1,10 ± 0,04	1,95 ± 0,73	2,18 ± 0,46	2,44 ± 2,14
	SLA	1,93 ± 0,81	2,77 ± 1,41	2,63 ± 1,61	1,92 ± 0,55

Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t pareado para variáveis com distribuição normal e Wilcoxon para variáveis de distribuição não normal, ou teste t do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

* Diferença estatisticamente significativa na comparação antes e após SLA em pacientes pré-tratamento.

† Diferença estatisticamente significativa na comparação meio pré e pós-tratamento.

‡ Diferença estatisticamente significativa na comparação SLA pré e pós-tratamento.

Tabela 5.2 – Porcentagem média de linfócitos T CD8⁺ expressando Granzima A, IFN- γ , TNF- α e IL-10 de pacientes com LV, pré e pós-tratamento, antes e após estímulo com SLA

CD8		Granzima A [†]	IFN- γ ** ^{†‡}	TNF- α ^{†‡}	IL-10
Pré-tratamento	Meio	36,64 \pm 13,00	3,54 \pm 1,68	4,92 \pm 1,86	3,36 \pm 1,96
	SLA	27,45 \pm 13,10	3,84 \pm 1,18	4,98 \pm 1,75	4,35 \pm 2,46
Pós-tratamento	Meio	10,53 \pm 5,37	2,74 \pm 0,72	2,06 \pm 0,64	3,86 \pm 2,67
	SLA	13,73 \pm 9,73	1,89 \pm 0,45	1,69 \pm 0,65	2,92 \pm 1,90

Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t pareado para variáveis com distribuição normal e Wilcoxon para variáveis de distribuição não normal, ou teste t do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

** Diferença estatisticamente significativa na comparação antes e após SLA em pacientes pós-tratamento.

[†] Diferença estatisticamente significativa na comparação meio pré e pós-tratamento.

[‡] Diferença estatisticamente significativa na comparação SLA pré e pós-tratamento.

5.1.2.2 Análise da média de frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de Granzima A, IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10 em pacientes tratados para Leishmaniose Visceral, antes e após estímulo com SLA

Após analisar as subpopulações linfocitárias, pré-tratamento, realizou-se análises das mesmas subpopulações, pós-tratamento, comparando essas células antes e após o estímulo com o SLA, com a finalidade de se estudar alterações que poderiam ter ocorrido nos linfócitos desses pacientes com LV, após a melhora clínica.

Não houve variação estatisticamente significativa na frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de INF- γ , TNF- α , IL-17 ou IL-10, em pacientes tratados para LV, quando comparado antes e após estímulo com SLA (tabela 5.1). Esse resultado foi um pouco diferente do demonstrado, anteriormente, ao comparar os linfócitos T CD4⁺ antes do tratamento, uma vez que o SLA induziu o aumento da expressão de IFN- γ no início da infecção, antes do tratamento da LV.

Observou-se redução significativa na média de frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ , em pacientes com LV tratada, quando comparado antes e

após estímulo com SLA (figura 5.3) (tabela 5.2). O SLA não induziu diminuição na média de frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ de pacientes pré-tratamento, como já foi dito anteriormente.

Da mesma forma, como observado antes do tratamento, não houve variação com significância estatística na frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de Granzima A, TNF- α , IL-17 ou IL-10 em pacientes tratados para LV, quando comparado antes e após estímulo com SLA (tabela 5.2).

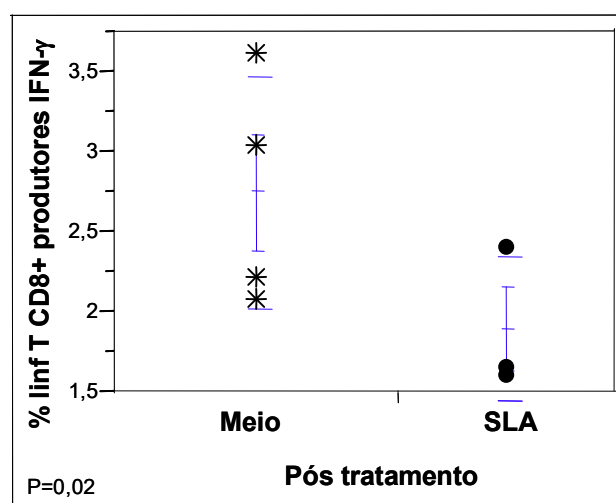


Figura 5.3: Comparação da média de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ em pacientes tratados para LV, antes e após estímulo antígeno específico. As células do sangue periférico de pacientes previamente tratados para LV (N=5) foram mantidas em cultura sem estímulo (meio) ou estimuladas com 15 μ g/mL de SLA. Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-IFN- γ PE e anti-CD8 PECy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t pareado para variáveis com distribuição normal e Wilcoxon para variáveis de distribuição não normal. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5.1.3 Comparação da frequência de linfócitos T duplo negativos CD4⁻CD8⁻ (DN) expressando o TCR $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, pré e pós-tratamento específico para Leishmaniose, antes e após estímulo com SLA

5.1.3.1 Análise da expressão de TCR $\alpha\beta$ em linfócitos T CD4⁻CD8⁻ (DN) em pacientes com Leishmaniose Visceral

Não foi possível realizar a análise da expressão de TCR $\alpha\beta$ em linfócitos T dos pacientes com LV estudados devido ao protocolo de congelamento utilizado, que provavelmente pode ter ocasionado alguma alteração na expressão do marcador TCR $\alpha\beta$ na superfície dos linfócitos.

5.1.3.2 Análise da expressão de TCR $\gamma\delta$ em linfócitos T CD4⁻CD8⁻ (DN) em pacientes com Leishmaniose Visceral pré-tratamento, após estímulo com SLA

Conforme observado na figura 5.4, quando comparado antes (3,55% +/- 2,66%) e após (2,71% +/- 1,56%) a estimulação com SLA, houve pequena redução na frequência média de linfócitos T duplo negativos CD4⁻CD8⁻ expressando o TCR $\gamma\delta$, em pacientes no início dos sintomas, ainda sem tratamento específico para a LV. Apesar dessa redução ser pequena ela foi significativa, o que pode ser explicado pela pequena frequência dessa subpopulação no sangue periférico.

Ao analisar os pacientes após o tratamento específico para LV, observa-se que não houve significância estatística na variação da média de frequência de linfócitos T duplo negativos CD4⁻CD8⁻ expressando TCR $\gamma\delta$ antes (1,88% +/- 0,62%) e após (1,60% +/- 0,63%) o estímulo com SLA.

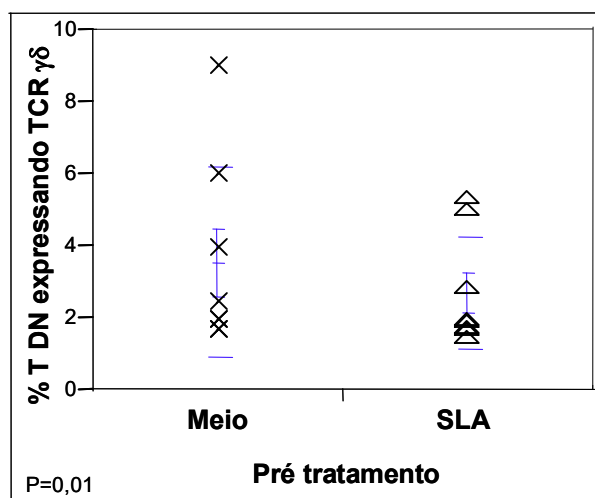


Figura 5.4: Comparação da média de linfócitos T CD4⁺CD8⁻ (DN) expressando TCR $\gamma\delta$, em pacientes com LV pré-tratamento, antes e após estímulo antígeno específico. As células do sangue periférico de pacientes com LV (N=8) foram mantidas em cultura sem estímulo (meio) ou estimuladas com 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SLA. Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-TCR $\gamma\delta$ FITC, anti-CD4 PEcy5 e anti-CD8 PEcy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t pareado para variáveis com distribuição normal e Wilcoxon para variáveis de distribuição não normal. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5.2 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADOR DE MEMÓRIA E PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM LINFÓCITOS E MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL PRÉ E PÓS-TRATAMENTO ESPECÍFICO

5.2.1 Comparação da frequência de subpopulações de linfócitos T expressando CD45RO nos pacientes com Leishmaniose Visceral pré e pós-tratamento específico

5.2.1.1 Diminuição na frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO, antes de serem estimulados com SLA, em pacientes tratados para Leishmaniose Visceral

Quando comparados antes (34,83% +/- 15,21%) e após (10,28% +/- 6,30%) o tratamento específico para a leishmaniose, observou-se redução significativa na média de frequência de linfócitos T CD8⁺, não estimulados com SLA, expressando CD45RO (figura 5.5).

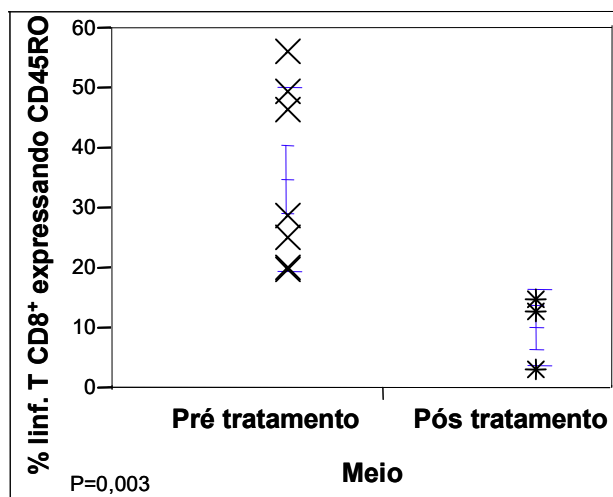


Figura 5.5: Comparação da frequência média de linfócitos T CD8⁺ não estimulados com SLA expressando CD45RO, em pacientes com LV pré e pós-tratamento específico. As células do sangue periférico de pacientes com LV pré (N=8) e pós (N=5) tratamento foram mantidas em cultura sem estímulo com SLA (meio). Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-CD45RO PE e anti-CD8 PECy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Não foi observada variação significativa na frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RO em meio (antes do estímulo com SLA) quando comparado antes (29,20% +/- 15,60%) e após (24,58% +/- 13,71%) o tratamento da LV.

5.2.1.2 Diminuição na frequência de linfócitos T CD8⁺, estimulados com SLA, expressando CD45RO, em pacientes tratados para Leishmaniose Visceral

Ao analisar a expressão de CD45RO em linfócitos T CD8⁺ estimulados com SLA, houve redução significativa na frequência de expressão de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO quando comparado pré (33,90% +/- 14,63%) e pós-

tratamento (21,27% +/- 9,34%) da LV (figura 5.6), como também observado antes do estímulo com SLA.

Não houve variação significativa na frequência de linfócitos T CD4⁺, estimulados com SLA, expressando CD45RO quando comparado antes (29,29% +/- 13,43%) e após (32,80% +/- 12,26%) o tratamento específico para LV.

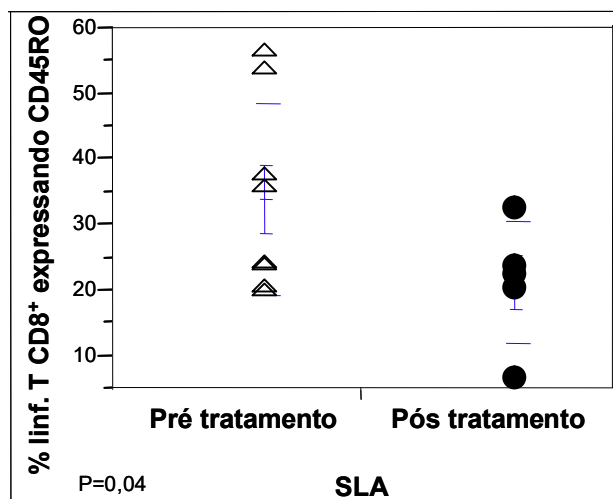


Figura 5.6: Comparação da frequência média de linfócitos T CD8⁺ estimulados com SLA expressando CD45RO, em pacientes com LV pré e pós-tratamento específico. As células do sangue periférico de pacientes com LV pré (N=8) e pós (N=5) tratamento foram mantidas em cultura com 15 µg/mL de SLA. Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-CD45RO PE e anti-CD8 PECy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5.2.2 Comparação da frequência de subpopulações de linfócitos expressando marcador de citotoxicidade e produzindo citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes com Leishmaniose Visceral pré e pós-tratamento

5.2.2.1 Diminuição da média de frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ antes e após estímulo com SLA e de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17 não estimulados com SLA, em pacientes com Leishmaniose Visceral quando comparados pré e pós-tratamento

A figura 5.7 demonstra diminuição significativa na frequência média de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , quando comparados pré e pós-tratamento para LV, tanto antes (A) quanto após (B) o estímulo com SLA.

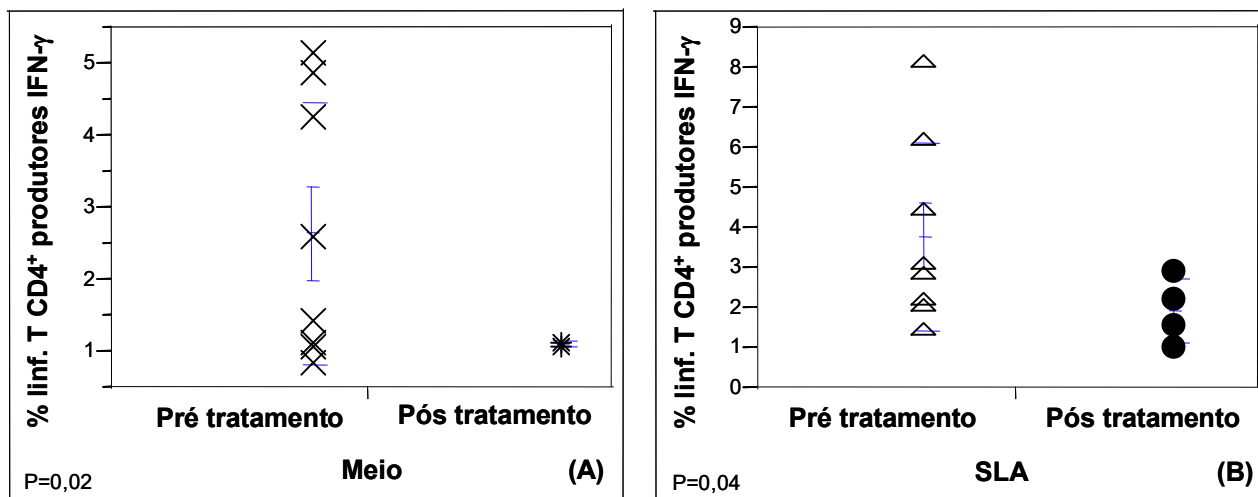


Figura 5.7: Comparação da frequência média de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ em pacientes com LV pré e pós-tratamento específico, antes e após estímulo com SLA. As células do sangue periférico de pacientes com LV pré (N=8) e pós-tratamento (N=5) foram mantidas em cultura sem estímulo (meio) ou estimuladas com 15 μ g/mL de SLA. Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-IFN- γ PE e anti-CD4 PECy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Como observado na figura 5.8, nos linfócitos de pacientes pós-tratamento da LV, houve redução significativa na frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17 antes do estímulo com SLA (meio). Essa variação não se mostrou significativa quando comparado após o estímulo com SLA (tabela 5.1).

Não houve variação significativa na expressão de TNF- α e IL-10 em linfócitos T CD4⁺, estimulados ou não com SLA, quando comparados pré e pós-tratamento específico para LV (tabela 5.1).

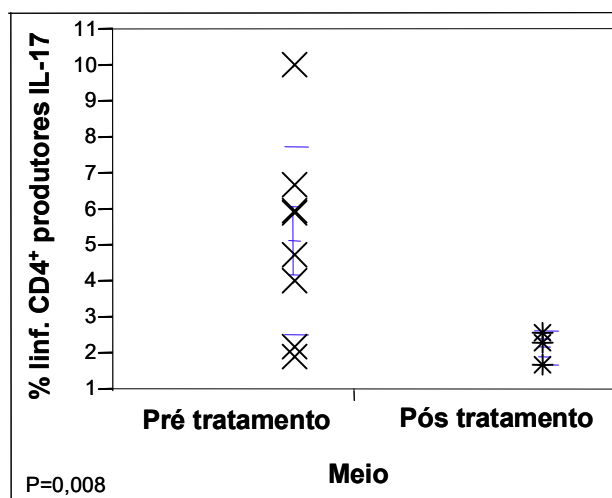


Figura 5.8: Comparação da frequência média de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17 não estimulados com SLA, em pacientes com LV pré e pós-tratamento específico. As células do sangue periférico de pacientes com LV pré (N=8) e pós-tratamento (N=5) foram mantidas em cultura sem estímulo com SLA (meio). Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-IL17 PE e anti-CD4 PECy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5.2.2.2 Diminuição da média de frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de Granzima A antes do estímulo com SLA e de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e TNF- α estimulados ou não com SLA, em pacientes com Leishmaniose Visceral quando comparados pré e pós-tratamento.

Quando comparada pré e pós-tratamento específico para leishmaniose, houve diminuição na média de frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de Granzima A, antes do estímulo com SLA (figura 5.9). Após o estímulo com SLA, a comparação pré e pós-tratamento da LV dessa subpopulação celular não apresentou variação significativa.

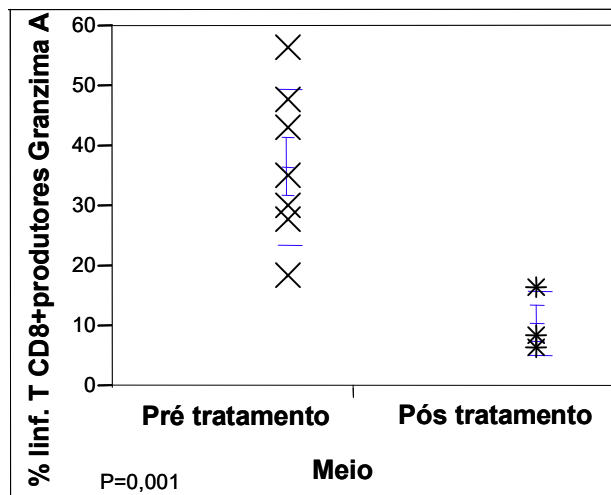


Figura 5.9: Comparação da média da frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de Granzima A não estimulados com SLA, de pacientes com LV pré e pós-tratamento específico. As células do sangue periférico de pacientes com LV pré (N=8) e pós-tratamento (N=5) foram mantidas em cultura sem estímulo com SLA (meio). Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-Granzima A PE e anti-CD8 PECy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Observou-se redução significativa na frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e de TNF- α (figuras 5.10 e 5.11) (tabela 5.2) pré e pós-tratamento, tanto antes (A) quanto após (B) o estímulo com SLA.

Não houve variação significativa na frequência de linfócitos T CD8⁺, estimulados ou não com SLA, produtores de IL-10, quando comparados pré e pós-tratamento para LV (tabela 5.2).

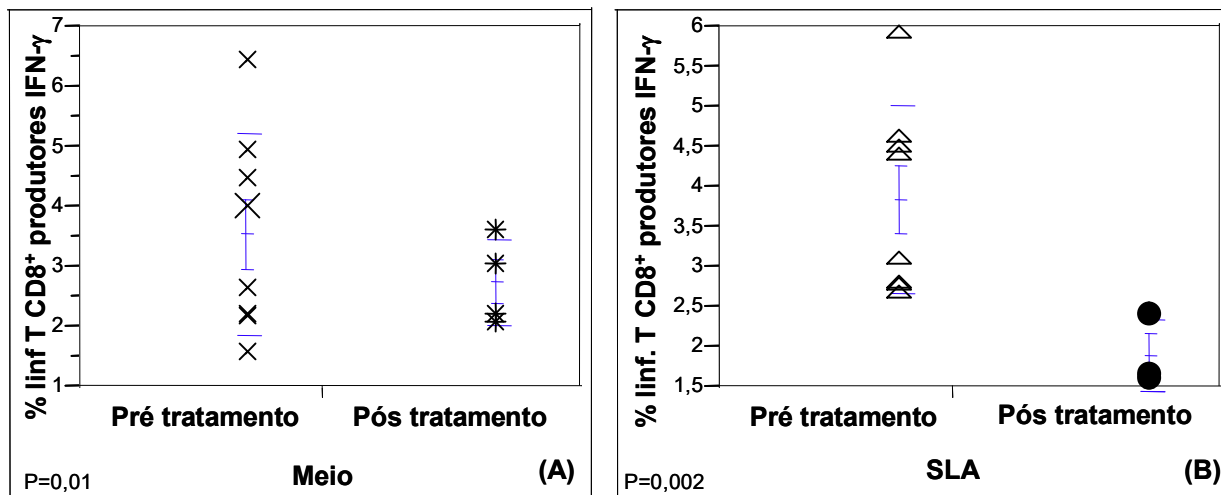


Figura 5.10: Comparação da média da frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ estimulados (B) ou não (A) com SLA, de pacientes com LV pré e pós-tratamento específico. As células do sangue periférico de pacientes com LV pré (N=8) e pós-tratamento (N=5) foram mantidas em cultura sem estímulo (meio) ou estimuladas com 15 μ g/mL de SLA. Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-IFN- γ PE e anti-CD8 PECy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$

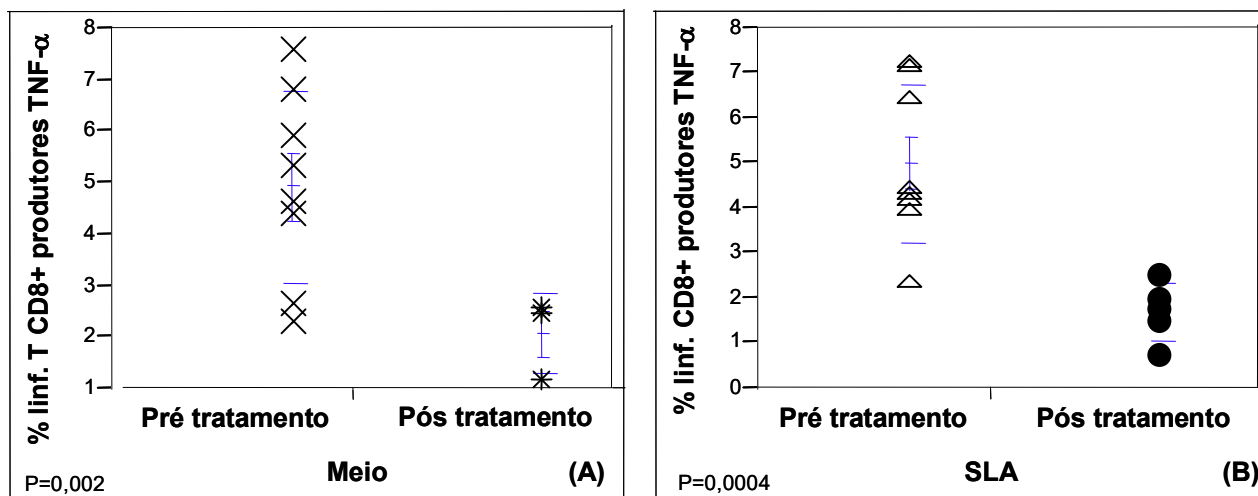


Figura 5.11: Comparação da média da frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de TNF- α estimulados (B) ou não (A) com SLA, de pacientes com LV pré e pós-tratamento específico. As células do sangue periférico de pacientes com LV pré (N=8) e pós-tratamento (N=5) foram mantidas em cultura sem estímulo (meio) ou estimuladas com 15 μ g/mL de SLA. Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-TNF- α PE e anti-CD8 PEcy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5.2.2.3 Diminuição da média de frequência de linfócitos T CD4⁺CD28⁻ produtores de IL-10 após estímulo com SLA, em pacientes com Leishmaniose Visceral pós-tratamento

Analisou-se também, a frequência de linfócitos T CD4⁺CD28⁻. A molécula CD28 é uma proteína de membrana coestimuladora de linfócitos T que se liga a moléculas B7 expressas nas células apresentadoras de antígenos. O CD28 participa da transdução de sinais, como segundo sinal em células T, juntamente com o complexo TCR (primeiro sinal). O CD28 é a principal molécula para liberar segundo sinal e para a ativação de células T. Após ativação dos linfócitos T ocorre redução da expressão do CD28. Portanto, a subpopulação de linfócitos T CD4⁺CD28⁻ é composta por células T previamente ativadas.

Houve diminuição na média de frequência de linfócitos T CD4⁺CD28⁻ produtores de IL-10, após o estímulo com SLA, quando comparada pré e pós-tratamento específico para LV (figura 5.12) (tabela 5.3).

Não se observou alteração na média de frequência de linfócitos T CD4⁺CD28⁻ produtores de IL-10, antes do estímulo com SLA (meio), quando comparada pré e pós-tratamento da LV (tabela 5.3).

Também não foi observada variação significativa na frequência de linfócitos T CD4⁺CD28⁻ produzindo TNF- α , quando comparados pré e pós-tratamento, tanto antes quanto após o estímulo com SLA (tabela 5.3).

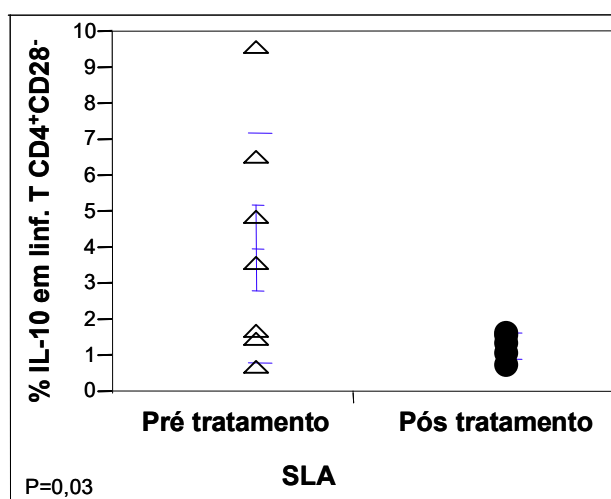


Figura 5.12: Comparação da média da frequência de linfócitos T CD4⁺CD28⁻ produtores de IL-10 após a estimulação com SLA, em pacientes com LV pré e pós-tratamento específico. As células do sangue periférico de pacientes com LV pré (N=8) e pós-tratamento (N=5) foram mantidas em cultura após estímulo com 15 μ g/mL de SLA. Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os leucócitos marcados com anticorpos anti-CD28 FITC, anti-IL-10 PE e anti-CD4 PECy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Tabela 5.3 – Porcentagem média de linfócitos T CD4⁺CD28⁻ expressando TNF- α e IL-10, em pacientes com LV, pré e pós-tratamento, antes e após estímulo com SLA.

CD4 ⁺ CD28 ⁻		TNF- α	IL-10 [‡]
Pré- tratamento	Meio	1,77 \pm 0,82	1,15 \pm 0,56
	SLA	2,39 \pm 0,98	3,99 \pm 3,18
Pós- tratamento	Meio	2,32 \pm 0,60	3,58 \pm 2,49
	SLA	2,31 \pm 1,10	1,29 \pm 0,36

Os resultados foram mostrados como porcentagem média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t pareado para variáveis com distribuição normal e Wilcoxon para variáveis de distribuição não normal ou teste t do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

[‡] Diferença estatisticamente significativa na comparação SLA pré e pós-tratamento

5.2.3 Análise da frequência de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α e IL-10 de pacientes com Leishmaniose Visceral pré e pós-tratamento

A participação dos monócitos na produção das citocinas pró-inflamatória TNF- α e anti-inflamatória IL-10 ainda é pouco estabelecida na LV.

Observa-se na figura 5.13 a redução estatisticamente significativa na frequência de monócitos CD14⁺, estimulados com SLA, produzindo TNF- α , quando comparada antes e após o tratamento da LV.

Não ocorreu variação com significância estatística na frequência média de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α , pré e pós-tratamento, quando em meio. Também não se observou variação significativa na frequência de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10, quando comparados pré e pós-tratamento da LV, tanto antes quanto após estimulação com SLA (tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Porcentagem média de monócitos CD14⁺ expressando TNF- α e IL-10 de pacientes com LV, pré e pós-tratamento, antes e após estímulo com SLA

CD14 ⁺		TNF- α ‡	IL-10
Pré- tratamento	Meio	4,94 \pm 2,52	4,83 \pm 2,97
	SLA	6,98 \pm 3,65	6,71 \pm 5,19
Pós- tratamento	Meio	3,92 \pm 0,58	3,62 \pm 1,73
	SLA	4,33 \pm 1,15	3,90 \pm 1,46

Os resultados foram mostrados como porcentagem média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste t pareado para variáveis com distribuição normal, ou teste t do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

‡ Diferença estatisticamente significativa na comparação SLA pré e pós-tratamento da LV

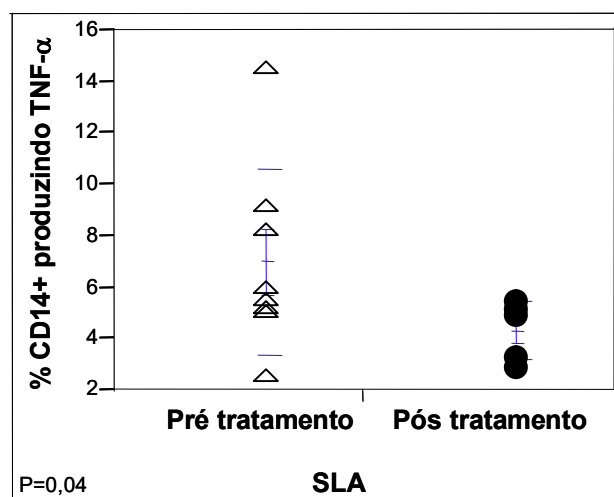


Figura 5.13: Comparação da média da frequência de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α após estimulação com SLA, de pacientes com LV pré e pós-tratamento específico. As células do sangue periférico de pacientes com LV pré (N=8) e pós-tratamento (N=5) foram mantidas em cultura após estímulo com 15 μ g/mL de SLA. Após 6 horas de cultura as hemácias foram lisadas e os monócitos marcados com anticorpos anti-CD14 FITC e anti-TNF- α PE e analisados utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. As médias foram comparadas usando programa estatístico JMP, teste T do Excel para variáveis desiguais de duas amostras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS T CD4⁺, CD8⁺ E MONÓCITOS EXPRESSANDO CITOCINAS ANTES E APÓS ESTÍMULO COM SLA, EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Na LV, a importância das células produtoras de citocinas pró e anti-inflamatórias, assim como, a expressão de coestimuladores e marcadores de memória e citotoxicidade ainda não estão totalmente estabelecidos. A correlação entre monócitos e citocinas produzidas por estas células também é pouco conhecida. Dessa forma, realizou-se a análise de correlação de linfócitos T e monócitos expressando tais marcadores em pacientes com LV, pré e pós-tratamento específico, tanto antes quanto após o estímulo com SLA.

5.3.1 Correlação entre a frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de citocina pró-inflamatória IFN- γ e a frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando CD28

Observa-se correlação positiva ($R^2=0,76$) entre a frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e a frequência de linfócitos T CD4⁺CD28⁺ de pacientes com LV, pré-tratamento, antes de serem estimulados com SLA (figura 5.14). Após o estímulo com SLA ou após o tratamento a correlação entre essas subpopulações celulares não se manteve.

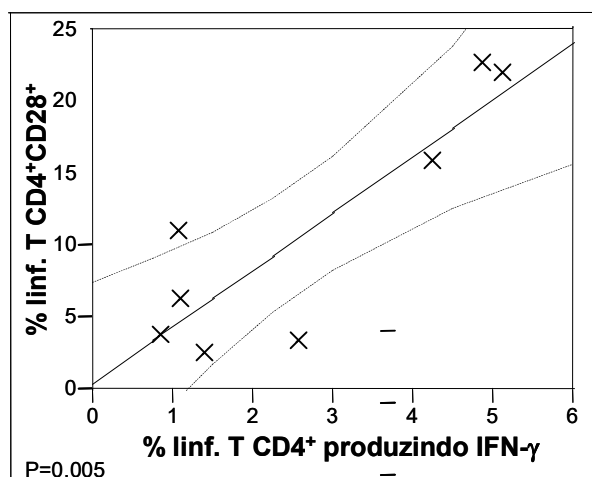


Figura 5.14: Correlação entre linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e linfócitos T CD4⁺CD28⁺ em pacientes pré-tratamento para LV, antes do estímulo com SLA. Os resultados foram obtidos utilizando análise de correlação do programa de estatística JMP. Os resultados foram apresentados com "fit line", com curvas de intervalo de confiança de 95%, e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ (N=8).

5.3.2 Correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando IFN- γ e a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO, Granzima A, e IL-10 nos pacientes com Leishmaniose Visceral pré-tratamento.

Conforme a figura 5.15, observa-se correlação positiva ($R^2=0,60$) entre a frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO, em pacientes com LV pré-tratamento, antes do estímulo com SLA (A). Esse resultado sugere que a produção de citocina pró inflamatória IFN- γ está relacionada com células experientes na LV.

No gráfico B da mesma figura, observa-se correlação positiva ($R^2=0,69$) entre linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (expressando Granzima A) e linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ .

No gráfico C, correlacionam-se positivamente ($R^2=0,52$) os linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e os linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-10, sugerindo imunomodulação nessa subpopulação linfocitária.

Após o estímulo com SLA ou após-tratamento da LV nenhuma dessas correlações se manteve.

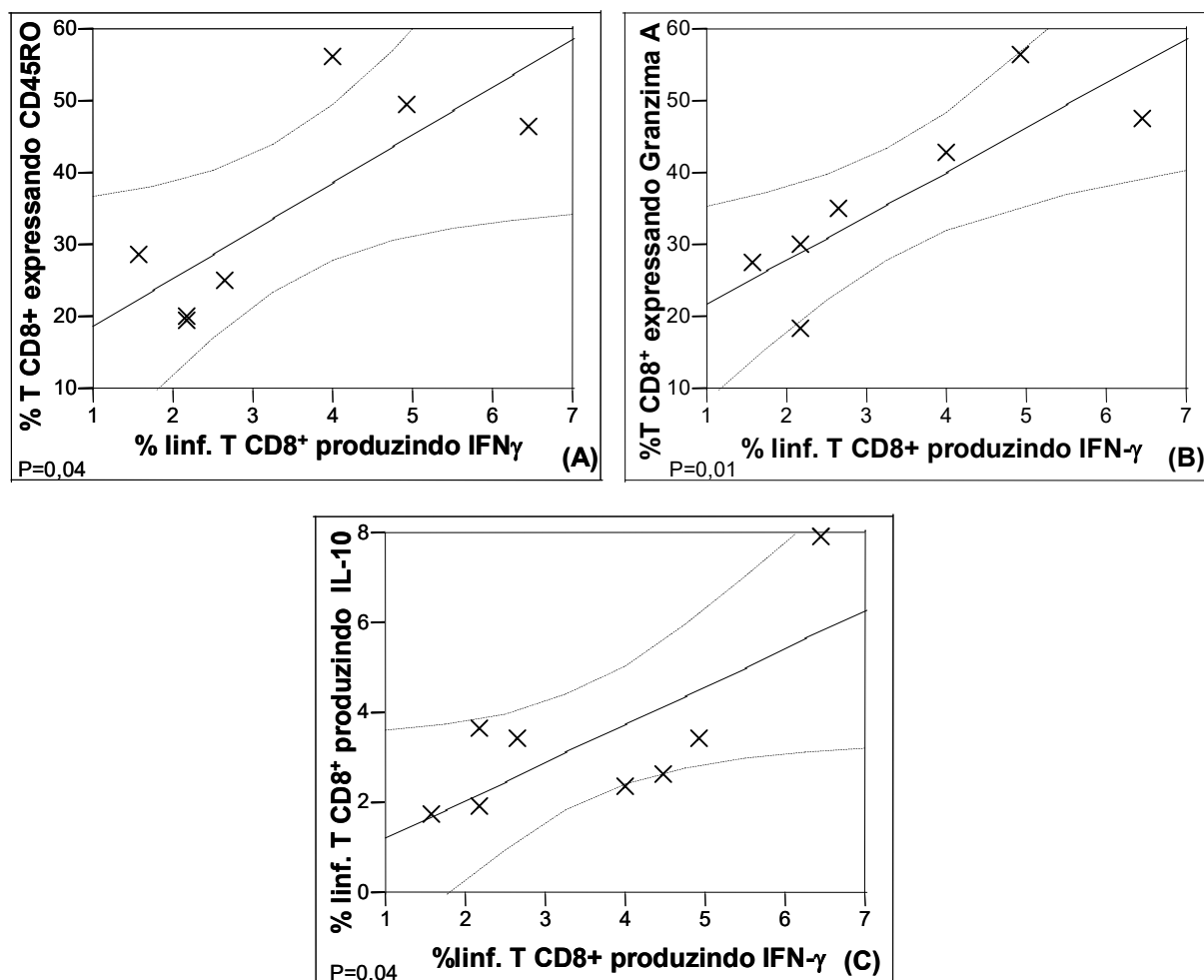


Figura 5.15: Correlação entre linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO (A), Granzima A (B) e IL-10 (C) em pacientes pré-tratamento para LV, antes do estímulo com SLA. Os resultados foram obtidos utilizando análise de correlação do programa de estatística JMP. Os resultados foram apresentados com “fit line”, com curvas de intervalo de confiança de 95%, e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ (N=8).

5.3.3 Correlação entre a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO e frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando Granzima A nos pacientes com Leishmaniose Visceral

Semelhante às correlações acima, observou-se correlação positiva ($R^2=0,70$) entre a subpopulação de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO e a

subpopulação de linfócitos T CD8⁺ expressando Granzima A (figura 5.16) em células de pacientes com LV pré-tratamento, antes do estímulo com SLA.

Após o estímulo com SLA ou após-tratamento da LV esta correlação não se manteve.

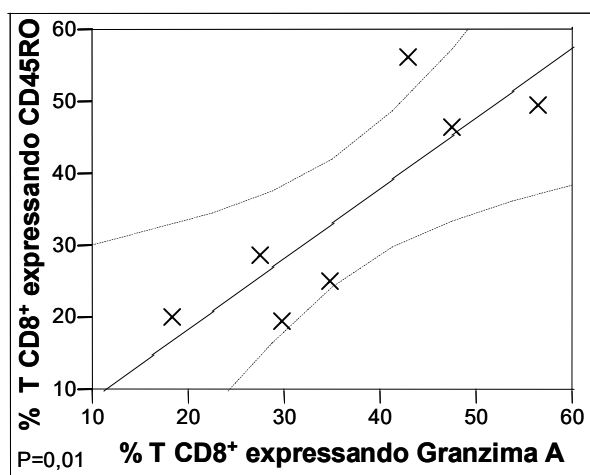


Figura 5.16: Correlação entre linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO e linfócitos T CD8⁺ expressando Granzima A em pacientes pré-tratamento para LV, antes do estímulo com SLA. Os resultados foram obtidos utilizando análise de correlação do programa de estatística JMP. Os resultados foram apresentados com “fit line”, com curvas de intervalo de confiança de 95%, e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ ($N=8$).

5.3.4 Correlação positiva entre a frequência de monócitos e a frequência de monócitos CD14⁺ produtores de citocinas pró-inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10)

Houve correlação positiva entre a porcentagem total de monócitos e a frequência de monócitos CD14⁺ produtores da citocina pró-inflamatória TNF- α ($R^2=0,72$) e anti-inflamatória IL-10 ($R^2=0,56$) em pacientes com LV pré-tratamento sem estímulo com SLA (figura 5.17).

Após o estímulo com SLA essa correlação não se manteve.

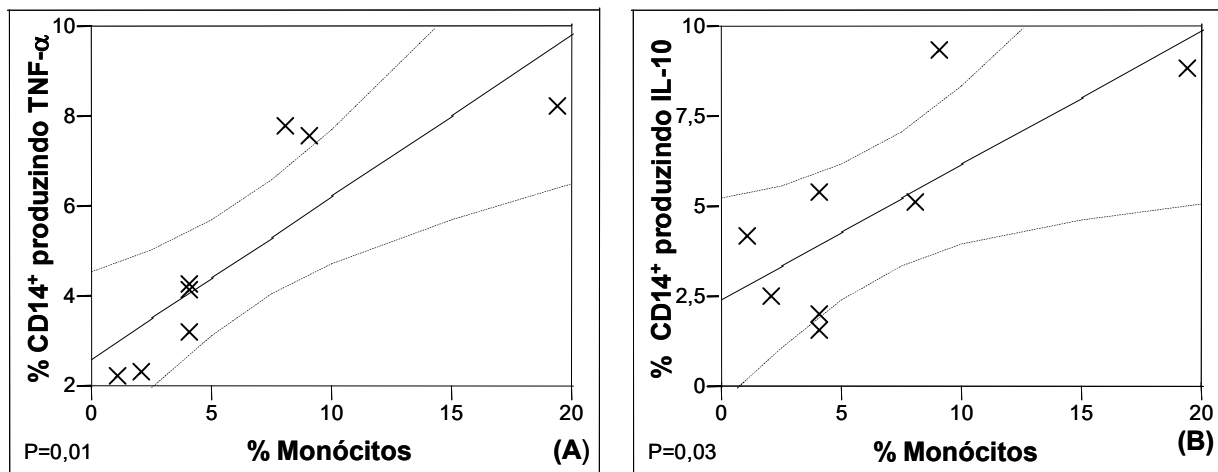


Figura 5.17: Correlação entre a porcentagem total de monócitos e a porcentagem de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- γ (A) e correlação entre a porcentagem total de monócitos e a porcentagem de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10 (B) em pacientes pré-tratamento para LV, antes do estímulo com SLA. Os resultados foram obtidos utilizando análise de correlação do programa de estatística JMP. Os resultados foram apresentados com “fit line”, com curvas de intervalo de confiança de 95%, e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ (N=8).

5.3.5 Correlação positiva entre a frequência de monócitos CD14⁺ produtores de citocinas pró-inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10)

Prosseguindo a análise de correlação em monócitos, observa-se correlação positiva ($R^2=0,62$) entre a frequência de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α e a frequência de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10, não estimulados com SLA, em pacientes com LV antes do tratamento específico.

Essa correlação não se manteve presente após estimulação com SLA.

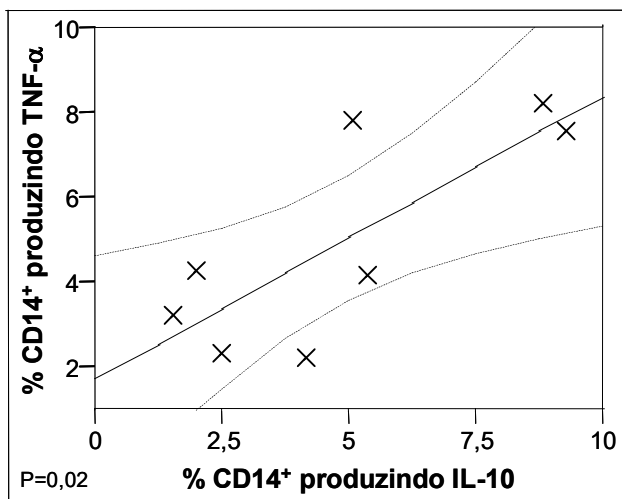


Figura 5.18: Correlação entre a porcentagem de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α e a porcentagem de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10 em pacientes pré-tratamento para LV, antes do estímulo com SLA. Os resultados foram obtidos utilizando análise de correlação do programa de estatística JMP. Os resultados foram apresentados com “fit line”, com curvas de intervalo de confiança de 95%, e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ (N=8).

6 DISCUSSÃO

Assim como em outras doenças infecciosas, o espectro clínico da LV, desde as formas assintomáticas até as graves, e o controle da infecção são influenciados pela relação parasita-hospedeiro. Grande parte dos pacientes infectados pelo parasita não irão desenvolver forma clínica da doença, os quais apresentam apenas exames sorológicos sugerindo o contato prévio com a *Leishmania* (KHALIL, 2002; BADARO, 1986; EVANS, 1992).

A LV está associada à supressão na produção de citocinas de padrão Th1, como IFN- γ e IL-12, e ao aumento de produção de citocinas como IL-4 e IL-10, em linfócitos *in vitro* após estimulação com antígenos de leishmania (KHARAZMI, 1999; CARVALHO, 1985, BACELLAR, 2000). A inabilidade no controle da infecção pela *Leishmania* parece estar associada à irresponsividade das células T aos antígenos da *Leishmania* e à produção de IL-10. A IL-10 bloqueia a ativação Th1 e a resposta citotóxica pela regulação negativa na produção de IL-12 e IFN- γ . A IL-10 também inibe a ativação de macrófagos e a habilidade dessas células em matar a *Leishmania* (RIBEIRO-DE-JESUS, 1998). Trabalhos mais recentes têm sugerido maior complexidade da resposta imune na LV, com correção de citocinas pró e anti-inflamatórias, e aumento sérico de IFN- γ e IL-10 em pacientes com doença ativa quando comparados à população não infectada (CALDAS, 2005; PERUHYPE-MAGALHÃES *et al*, 2006). Em estudos experimentais de vacinas contra LV, a imunidade à doença tem se mostrado dependente tanto dos linfócitos T CD4⁺ quanto dos T CD8⁺, pois ambas as subpopulações têm grande aumento na produção de IFN- γ , após a estimulação vacinal (BHAUMIK, NASKAR, DE, 2009).

O estudo aqui exposto avaliou a expressão de um marcador de experiência/memória, a expressão de marcadores de citotoxicidade e a produção de citocinas por células do sangue periférico de pacientes com LV. Determinou-se a expressão desses marcadores antes e após a estimulação das células com

antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), tanto no início da doença, pré-tratamento específico, quanto após o término do tratamento. O objetivo era avaliar se havia diferença na expressão de tais marcadores pelas subpopulações celulares estudadas antes e após a estimulação com SLA e pré e pós-tratamento da LV.

Avaliou-se a expressão da molécula CD45RO em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com LV. O CD45RO desempenha papel importante na sinalização mediada pelo receptor antigênico de linfócitos T e está associado à experiência/memória. Estudou-se também a expressão de Granzima A pelos linfócitos T CD8⁺, um marcador de citotoxicidade nessa subpopulação celular. Analisou-se a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-17) e anti-inflamatória (IL-10) nas subpopulações celulares estudadas com o objetivo de caracterizar fenotipicamente e funcionalmente o perfil das subpopulações de linfócitos T e monócitos na doença.

Ao analisar os resultados, observou-se que o estímulo antigênico com SLA não foi capaz de induzir alteração na frequência do marcador de experiência/memória CD45RO em nenhuma das subpopulações linfocitárias estudadas em pacientes no início dos sintomas, antes do tratamento da LV. Após o tratamento dos pacientes, entretanto, o estímulo com SLA foi capaz de induzir aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO (figura 5.1). Esse achado sugere que a doença gerou o aparecimento de linfócitos T CD8⁺ de memória, que se mantiveram após o tratamento e responderam ao estímulo com antígeno específico. Interessante observar a diminuição da frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando a molécula de memória CD45RO, ao serem comparados pacientes pré e pós-tratamento da LV (figuras 5.5 e 5.6). A diminuição desta subpopulação celular, ou seja, linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO sugere que, provavelmente, essas células desempenham papel mais específico durante a infecção ativa que após a cura da doença, ou talvez, na doença ativa elas estejam mais amplificadas, e após melhora da doença sofram diminuição de frequência. A população de linfócitos T CD8⁺ expressando o marcador de experiência/memória para a LV, de acordo com os resultados aqui apresentados, tende a diminuir após a cura, porém, mantém a capacidade de responder com aumento de frequência

quando em novo contato com o antígeno, caracterizando antígeno-especificidade nesses pacientes para essa doença. Diferente desses resultados, Clarêncio *et al.* (2009) observaram redução na frequência de linfócitos T CD8⁺ de sangue periférico expressando CD45RO durante a doença ativa, voltando a níveis mais altos de expressão do CD45RO tanto em linfócitos T CD8⁺ quanto em linfócitos T CD4⁺ após o tratamento da leishmaniose. Não se pode afirmar a razão da diferença desses achados, porém, Clarêncio trabalha com pacientes provenientes de São Luiz do Maranhão (Maranhão, Brasil) e Teresina (Piauí, Brasil), e a apresentação clínica e de gravidade dos pacientes provenientes dessas regiões parece ser diferente da dos pacientes provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil). A incidência de eventos hemorrágicos nos pacientes com LV no Maranhão e Piauí, por exemplo, parece ser superior à dos pacientes da Região Metropolitana de Belo Horizonte, enquanto as complicações infecciosas parecem ser mais comuns nestes que naqueles. A diferença de apresentação clínica entre tais pacientes pode ser secundária a diferentes cepas do parasita, a fatores genéticos, a fatores ambientais, a comorbidades infecciosas ou a fatores imunológicos ainda não bem definidos (dados não publicados).

Em relação à expressão de marcadores de experiência/memória em linfócitos T CD4⁺, em pacientes com LV, pesquisadores demonstraram frequência significativamente menor de linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺CD27⁺ em pacientes com doença ativa em comparação aos pacientes pós-tratamento ou a controles saudáveis (HAILU, 2005). Neste estudo, a frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RO não sofreu variação significativa quando comparado pré e pós-tratamento, porém, percebeu-se leve tendência ao aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RO após o estímulo com SLA em pacientes pós-tratamento para LV. Esses achados podem sugerir a importância de experiência/memória desta subpopulação celular, ou seja, linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RO tanto no início (antes do tratamento), quanto após a cura da doença. São necessários, entretanto, mais estudos para melhor conhecimento do real papel destas células na dinâmica da LV.

Os resultados demonstraram aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ produzindo IFN- γ após estimulação com SLA nos pacientes com LV, no início dos sintomas, antes do tratamento específico da leishmaniose (figura 5.2). Esse achado sugere a participação da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ na produção de IFN- γ , importante citocina para a ativação dos macrófagos. Além da ativação de macrófagos, a produção de IFN- γ auxilia na evolução à cura da doença, porém, na população em estudo, o aumento da produção dessa citocina parece não ter sido suficiente para o controle da enfermidade. O aumento na produção de IFN- γ após o estímulo com SLA não se manteve após o tratamento da LV, talvez pelo fato da doença já não estar mais em atividade. Resultado semelhante é descrito na leishmaniose cutânea, na qual os linfócitos T CD4⁺ são a principal população produtora de IFN- γ e na qual o SLA induz aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ produzindo IFN- γ quando comparado a linfócitos T CD4⁺ em meio não estimulados com SLA (BOTTREL, 2001). Percebe-se, portanto, que a antígeno-especificidade dessas células existe também para outras espécies de *Leishmania*, podendo sugerir até mesmo a existência de antígenos comuns ou similares entre as espécies que induzam a produção dessa citocina. Observou-se a redução na expressão de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ tanto antes quanto após o estímulo com SLA (figura 5.7), quando analisados pré e pós-tratamento. De forma semelhante, Caldas (2005) observou aumento dos níveis séricos de IFN- γ em pacientes com LV ativa e sua redução 30 dias após o tratamento da LV, porém, mantendo-se ainda em níveis mais elevados que os da população não doente.

Encontrou-se também redução significativa na frequência de linfócitos T CD4⁺ não estimulados com SLA produzindo IL-17, ao se comparar os pacientes pré e pós-tratamento da LV (figura 5.8). Essa redução não foi observada após o estímulo com SLA, comparando-se pré e pós-tratamento. Pouco se conhece sobre o papel da IL-17 na LV. Em pacientes com leishmaniose cutânea e com mucosa existe correlação direta entre o número de células expressando IL-17 nas lesões e a presença de inflamação celular no sítio da lesão (BACELLAR, 2009). A IL-17 parece ter papel importante no recrutamento de neutrófilos e conseqüentemente

na inflamação e tamanho das lesões da leishmaniose cutânea (LOPEZ KOSTKA, 2009). Tais dados sugerem que durante a LV ativa os linfócitos T CD4⁺ participam na produção de IFN- γ e IL-17, e após a cura ocorre imunomodulação de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e IL-17) com redução da produção de tais citocinas na subpopulação de linfócitos T CD4⁺ e possivelmente a redução do processo inflamatório associado à doença ativa. Não se observou alteração na frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando as citocinas pró-inflamatória TNF- α e anti-inflamatória IL-10, após o estímulo com SLA em pacientes pré ou pós-tratamento para LV. Estudos mais específicos a respeito da IL-17 e sua participação na LV precisam ser realizados.

Quando analisada a ação do SLA sobre as subpopulações linfocitárias, o SLA não foi capaz de induzir variação significativa na expressão tanto de Granzima A quanto das citocinas pró e anti-inflamatórias estudadas em linfócitos T CD8⁺ de pacientes pré-tratamento para LV. Após o tratamento da leishmaniose, o SLA não induziu alterações na frequência de linfócitos T CD8⁺ produzindo TNF- α ou IL-10. A frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando IFN- γ teve, entretanto, redução significativa após o estímulo com SLA (figura 5.3). Este achado sugere imunorregulação, com redução da frequência de linfócitos T CD8⁺ produzindo a citocina pró-inflamatória IFN- γ em pacientes com passado de LV tratada quando em novo contato com antígenos de *Leishmania*.

Ao comparar a subpopulação de linfócitos T CD8⁺ antes e após o tratamento da LV, foi encontrada nesta pesquisa redução na frequência de produção das citocinas pró inflamatórias IFN- γ e TNF- α , tanto antes quanto após o estímulo com SLA (figuras 5.10 e 5.11). Observou-se também redução na frequência de linfócitos T CD8⁺, não estimulados com SLA, expressando o marcador de citotoxicidade Granzima A, quando comparados antes e após o tratamento da LV (figura 5.9). Existem poucos estudos sobre a produção de Granzima A na LV, porém, em pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa foi demonstrado que o número de células produtoras de Granzima A se relaciona à extensão das lesões teciduais (FARIA *et al*, 2005). Aproximadamente 50 e 70% da Granzima A produzida na leishmaniose mucosa e na leishmaniose cutânea, respectivamente,

é expressa nas lesões teciduais pelos linfócitos T CD8⁺ (FARIA *et al*, 2005). Os achados deste trabalho de redução da expressão de Granzima A pelos linfócitos T CD8⁺ após-tratamento da LV são, portanto, sugestivos de imunomodulação após a resolução da doença com redução da atividade citotóxica e da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos linfócitos T CD8⁺ após a cura da doença. Os linfócitos T CD8⁺ não são considerados os principais produtores de IFN- γ na leishmaniose cutânea (BOTTREL, 2001), porém, no presente trabalho, observou-se que essa subpopulação linfocitária possui maior frequência de expressão de Granzima A, IFN- γ e TNF- α durante a doença ativa que após a cura, podendo sugerir importante participação dessa subpopulação celular na resposta imune da LV.

A dinâmica do sistema imune é extremamente complexa, e pouco se conhece sobre os mecanismos de imunopatogênese das doenças infecciosas. Avaliando a complexidade das interações celulares, os dados obtidos da aquisição na citometria de fluxo foram analisados quanto a possíveis correlações entre a expressão de moléculas nas subpopulações celulares. O IFN- γ é a principal e mais potente citocina envolvida na ativação de macrófagos e a IL-10 uma potente citocina anti-inflamatória, modulando a ativação de macrófagos induzida pelo IFN- γ . O estudo encontrou correlação direta entre a frequência de linfócitos T CD8⁺ produzindo IFN- γ e a frequência de linfócitos T CD8⁺ produzindo IL-10 (figura 5.15). Resultado semelhante foi encontrado por Peruhype-Magalhães *et al* (2006), na LV, ao determinar a correlação na produção de IFN- γ e IL-10 em leucócitos totais. Tal achado sugere o aumento simultâneo de uma citocina pró-inflamatória (IFN- γ) e uma citocina anti-inflamatória (IL-10), e, portanto, correção na produção de tais citocinas e no processo imune de evolução da doença.

Observou-se neste trabalho, redução pequena, porém significativa, na frequência média de linfócitos T duplo negativos CD4⁻CD8⁻ expressando TCR $\gamma\delta$ após o estímulo com SLA em pacientes ainda sem tratamento específico para a LV (figura 5.4). A subpopulação de células T duplo negativas CD4⁻CD8⁻ é a segunda em frequência de expressão de IFN- γ na leishmaniose cutânea, antecedida

apenas pela subpopulação de linfócitos T CD4⁺ (BOTTREL et al, 2001). Em indivíduos não infectados, aproximadamente 80% das células T CD4⁺CD8⁻ (DN) expressa TCR $\gamma\delta$ (Antonelli et al.,2006; GOLLOB et al, 2008). Apesar de não termos conseguido determinar a frequência de expressão dos linfócitos T CD4⁺CD8⁻ (DN) $\alpha\beta$, é interessante notar que a frequência média da expressão de linfócitos T CD4⁺CD8⁻ (DN) $\gamma\delta$ nos pacientes com LV ativa, pré-tratamento, foi de 3,55%. Na leishmaniose cutânea é descrito redução na frequência de linfócitos T DN $\gamma\delta$ (~1,27%) em relação aos controles não infectados (~3,17%). Ambas subpopulações $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ expressam frequências mais altas de IFN- γ , TNF- α e IL-10, porém, a subpopulação de células T CD4⁺CD8⁻ (DN) $\alpha\beta$ expressa com maior frequência IFN- γ e TNF- α , enquanto a subpopulação $\gamma\delta$ expressa mais IL-10, tanto em cultura com meio, quanto após o estímulo com SLA. Esses achados sugeriram importante papel dessas células na imunidade inata. A maior expressão de IL-10, na subpopulação de células T DN $\gamma\delta$, sugere papel regulador dessa subpopulação, enquanto a subpopulação $\alpha\beta$ teria papel na produção de citocinas inflamatórias (ANTONELLI et al, 2006). Na LV, LAGLER et al (2003) descreveram um paciente infectado com *Leishmania donovani* que exibiu alta frequência de linfócitos T CD4⁺CD8⁻ (DN) $\gamma\delta$ produzindo IFN- γ e TNF- α , porém, produzindo também alta frequência de IL-10 quando comparado a controles não infectados, sugerindo importante participação dessa subpopulação celular na resposta imune, e possível imunorregulação dessa subpopulação. A redução da expressão de TCR $\gamma\delta$ na subpopulação de linfócitos T CD4⁺CD8⁻ (DN) após o estímulo com SLA, no presente trabalho, pode, portanto, sugerir que o antígeno solúvel de *leishmania* é capaz de regular negativamente a expressão de algumas moléculas do sistema imune, entre elas o TCR $\gamma\delta$.

Este trabalho demonstrou correlação entre a frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando a molécula coestimuladora CD28 e linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ em pacientes, pré-tratamento, antes de serem estimulados com SLA (figura 5.14). Após o tratamento ou após o estímulo com SLA essa correlação não se manteve. Esse resultado sugere maior produção de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ ao mesmo tempo em que se encontra maior frequência de células com co-

estimulação recente, expressando CD28, nessa subpopulação linfocitária. Estudos descrevem, na leishmaniose cutânea, outras correlações não encontradas nesta pesquisa, como correlação positiva entre a expressão de CD45RO em linfócitos T CD4⁺ e a produção de IL-10 e IFN- γ nessa subpopulação após estímulo com SLA (ANTONELLI *et al*, 2004).

Observou-se também correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e linfócitos T CD8⁺ expressando o CD45RO, molécula que está relacionada à experiência/memória (figura 5.15A) e entre linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos expressando Granzima A (figura 5.15B), como também entre linfócitos T CD8⁺ expressando Granzima A e expressando CD45RO (figura 5.16), antes do estímulo com SLA, em pacientes com doença ativa pré-tratamento para LV. As correlações descritas acima não se mantiveram após o estímulo com SLA, sugerindo que este altera de modo distinto a proliferação/amplificação de tais células, modificando a correlação anteriormente existente. Essas correlações também não foram vistas após o tratamento para LV o que poderia sugerir que após a cura essa subpopulação linfocitária pode estar menos participativa na resposta imune que durante a doença ativa.

Observou-se correlação direta entre a porcentagem de monócitos e a frequência de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α , e entre a porcentagem de monócitos e a frequência de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10 no sangue periférico de pacientes com LV pré-tratamento, antes do estímulo com SLA (figura 5.17). Após o estímulo com SLA essa correlação não se manteve. Esse resultado sugere que o aumento percentual do número de monócitos se relaciona a maior produção de citocinas tanto pró quanto anti-inflamatória nessa subpopulação celular na LV. Os resultados também mostraram correlação positiva entre a frequência de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α e IL-10 em pacientes com LV, antes do tratamento. Pesquisas anteriores em pacientes com leishmaniose cutânea encontraram resultados semelhantes, com correlação positiva entre monócitos produzindo IL-10 e TNF- α tanto estimuladas com SLA (ANTONELLI, 2004; GAZE, 2006), quanto na cultura em meio sem estímulo, com estímulo com LACK ou

antiCD3CD28 (ANTONELLI, 2004). Esses resultados sugerem mecanismo de autorregulação da produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 na subpopulação de monócitos CD14⁺.

Os resultados ainda não esclarecem todo o mecanismo imune na LV, porém, a caracterização inicial e a determinação das diferentes funções das subpopulações linfocitárias e de monócitos no sangue periférico, podem ser importantes para abrir novos rumos na pesquisa em busca de novas terapêuticas e vacinas. O presente trabalho demonstrou a importância dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na LV, o complexo controle da produção de citocinas e a interação e modulação da resposta imune pelas subpopulações de linfócitos e de monócitos. Estudos mais aprofundados sobre a dinâmica e a imunorregulação dessas subpopulações devem ser realizados, para que no futuro possa ser aplicada a ciência em benefício da saúde de pessoas sob o risco de infecção ou até mesmo daqueles que já adquiriram a doença.

7 CONCLUSÕES

O SLA induziu aumento na frequência média de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ de pacientes com LV, antes do tratamento específico, porém não foi capaz de alterar a frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RO, TNF- α ou IL-17.

A subpopulação de linfócitos T CD4⁺ produtores de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17 apresentou diminuição de frequência, após o tratamento específico, da LV. Não houve variação significativa na frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RO ou produzindo TNF- α ou IL-10 quando comparados pré e pós-tratamento.

O SLA induziu diminuição da média de frequência de linfócitos T CD4⁺CD28⁻ produtores de IL-10 em pacientes com leishmaniose visceral pós-tratamento, porém não alterou a média de frequência de expressão de IL-10 em linfócitos T CD4⁺CD28⁻ pré-tratamento.

Observou-se correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando CD28 e a frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ em pacientes com LV pré-tratamento, antes do estímulo com SLA.

O SLA induziu aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO e diminuição de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ nos pacientes com LV após o tratamento específico; porém, o SLA não foi capaz de induzir alteração significativa na frequência de expressão de Granzima A, TNF- α e IL-10.

Os linfócitos T CD8⁺ apresentaram redução da expressão de CD45RO, Granzima A, IFN- γ e TNF- α quando comparados pré e pós-tratamento específico da LV. Não foi observada variação significativa na frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-10 pré e pós-tratamento.

Observou-se correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando IFN- γ e a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO, Granzima A e IL-10 nos pacientes com LV pré-tratamento. Após o tratamento ou após o estímulo com SLA essas correlações não se mantiveram.

Observou-se correlação entre a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RO e a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando Granzima A.

O SLA induziu redução na frequência média de linfócitos T CD4⁻CD8⁻ (DN) expressando o TCR $\gamma\delta$ em pacientes pré-tratamento, após o estímulo com SLA. Não houve variação na frequência de linfócitos T CD4⁻CD8⁻ (DN) expressando TCR $\gamma\delta$ quando comparada pré e pós-tratamento.

O SLA induziu redução na frequência de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α em pacientes pós-tratamento para LV. Não foi observada variação na frequência de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10.

Observou-se correlação positiva entre a frequência de monócitos totais e a frequência de monócitos CD14⁺ produtores de citocinas pró-inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) e correlação positiva entre a frequência de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α e IL-10 em pacientes com LV pré-tratamento.

8 PROPOSIÇÕES

Espera-se que este estudo inicial possa começar a auxiliar a desvendar os fatores que predispõem os indivíduos a desenvolver a LV. Fazem-se necessários estudos mais aprofundados, os quais contribuiriam para melhor conhecimento da doença e possivelmente para melhor controle da infecção, seja pelo desenvolvimento de vacinas, seja pelo uso de terapêuticas mais eficazes para tratamento dos pacientes. Propõe-se:

- Estudar aspectos imunológicos dos pacientes que apresentam LV clinicamente manifesta e aqueles com LV inaparente.
- Determinar aspectos imunológicos dos pacientes com LV que possam estar relacionados à gravidade da apresentação clínica da doença.
- Avaliar a correspondência entre níveis séricos de citocinas e a produção pelas subpopulações celulares na LV.
- Estudar aspectos imunológicos que possam estar associados à cura ou recidiva da LV após tratamento.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.7: p.861-870, out, 2003.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Cad Saúde Pública**, v.20, n.1: p.259-265, 2004.

ANTONELLI, L.R.; DUTRA, W.O.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M.; GOLLOB, K.J. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunol Lett**, v.101: p.226-230, nov, 2005.

ANTONELLI, L.R.; DUTRA, W.O.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K.J. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clin Exp Immunol**, v.136, n.2: p.341-348, maio, 2004.

ANTONELLI, L.R.; DUTRA, W.O.; OLIVEIRA, R.R.; TORRES, K.C.; GUIMARÃES, L.H.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K.J. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4⁻CD8⁻) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun**, v.74, n.11: p.6317-6323, nov, 2006.

ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.2, n.2: p.145-146, abril-jun, 1996.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res**, v.119, n.6: p.238-258, jun, 2004.

BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA, A. JR.; JERÔNIMO, S.; CARVALHO, E.M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v.12, n.8: p.1228-1231, agosto, 2000.

BACELLAR, O.; FARIA, D.; NASCIMENTO, M.; CARDOSO, T.M.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O.; SCOTT, P.; CARVALHO, E.M. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.200, n.1: p.75-78, jul, 2009.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LORENÇO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D.JR. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis**, v.154, n.4: p.639-649, out, 1986a.

BADARO, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D. JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.154, n.6: p.1003-1011, dez, 1986b.

BHAUMIK, S.K.; NASKAR, K.; DE T. Complete protection against experimental visceral leishmaniasis with complete soluble antigen from attenuated *Leishmania donovani* promastigotes involves Th1-immunity and down-regulation of IL-10. **Eur J Immunol**, v.39, n.8: p.2146-2160, agosto, 2009.

BOTTREL, R.L.A.; DUTRA, W.O.; MARTINS, F.A.; GONTIJO, B.; CARVALHO, E.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; ALMEIDA, R.P.; MAYRINK, W.; LOCKSKEY, R.; GOLLOB, K.J. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v.69, n.5: p.3232-3239, maio, 2001.

BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. **D.2.5 Taxa de incidência da leishmaniose visceral**. D - indicadores de morbidade e fatores de risco. Indicadores e dados básicos 2007, Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2007/d0205.def>>. Acesso em: 01 ago. 2009.

CALDAS, A.; FAVALI, C.; AQUINO, D.; VINHAS, V.; VAN WEYENBERGH, J.; BRODSKYN, C.; COSTA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infect Dis**, v.19, n.5: p.113-121, dez, 2005.

CARVALHO, E.M.; BADARÓ, R.; REED, S.G.; JONES, T.C.; JOHNSON, W.D. JR. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J Clin Invest**, v.76, n.6: p.2066-2069, dez, 1985.

CARVALHO, S.F.; LEMOS, E.M.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v.68, n.3: p.321-324, março, 2003.

CHAPPUIS, F.; RIJAL, S.; SOTO, A.; MENTEN, J.; BOELAERT, M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **BMJ**, v. 333, n.7571: p. 723-728, out, 2006.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.11: p.873-882, nov, 2007.

CLARÊNCIO, J.; DE OLIVEIRA, C.I.; FAVALI, C.; MEDINA, O.; CALDAS, A.; COSTA, C.H.; COSTA, D.L.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Could the lower frequency of CD8⁺CD18⁺CD45RO⁺ lymphocytes be biomarkers of human VL? **Int Immunol**, v. 21, n.2: p137-144, fev, 2009.

COSTA, C.H.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev Saúde Pública**, v.24: p.361-372, 1990.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol**, v.72, n.2: p.132-141, abril, 2002.

DANTAS-TORRES, F. Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Rev Saúde Pública**, v.40, n.3: p.537-541, 2006.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, n.3: p.239-243, maio-jun, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.27, n.5: p.305-318, set, 2004.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am J Trop Med Hyg**, v.55, n.2: p.125-130, agosto, 1996.

EISERT, V.; MÜNSTER, U.; SIMON, M.M.; MOLL, H. The course of *Leishmania major* infection in mice lacking granzyme-mediated mechanisms. **Immunobiology**, v.205, n.3: p.314-320, jul, 2002.

FARIA, D.R.; GOLLOB, K.J.; BARBOSA, J. J.R.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.R.; LESSA, H.; CARVALHO, L.P.; ROMANO-SILVA, M.A.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; DUTRA, W.O. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses

observed in mucosal leishmaniasis. **Infect Immun**, v.73, n.12: p.7853-7859, dez, 2005.

FERNANDEZ-GUERRERO, M.L.; ROBLES, P.; RIVAS, P.; MAJER, F.; MUNIZ, G.; DE GORGOLAS, M. Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. **Acta Trop**, v. 90: p.11-16, 2004.

GAMA, M.E.A.; COSTA, J.M.L.; GOMES, C.M.C.; CORBETT, C.E.P. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.99, n.8: p. 889- 893, 2004.

GAZE, S.T.; DUTRA, W.O.; LESSA, M.; LESSA, H.; GUIMARÃES, L.H.; JESUS, A.R.; CARVALHO, L.P.; MACHADO, P.; CARVALHO, E.M.; GOLLOB, K.J. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. **Scand J Immunol**, v.63, n.1: p.70-78, jan, 2006.

GOLLOB, K.J.; ANTONELLI, L.R.; FARIA, D.R.; KEESEN, T.S.; DUTRA, W.O. Immunoregulatory mechanisms and CD4⁺CD8⁻ (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. **Int Immunopharmacol**, v.8, n.10: p.1338-1343, out, 2008.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.; BRYCESON, A.D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n.8: p.494-501, agosto, 2002.

HAILU, A.; VAN BAARLE, D.; KNOL, G.J.; BERHE, N.; MIEDEMA, F.; KAGER, P.A. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clin Immunol**, v.117, n.2: p.182-191, nov, 2005.

JERONIMO, S.M.; DUGGAL, P.; BRAZ, R.F.; CHENG, C.; MONTEIRO, G.R.; NASCIMENTO, E.T.; MARTINS, D.R.; KARPLUS, T.M.; XIMENES, M.F.; OLIVEIRA, C.C.; PINHEIRO, V.G.; PEREIRA, W.; PERALTA, J.M.; SOUSA, J.; MEDEIROS, I.M.; PEARSONI, R.D.; BURNS, T.L.; PUGH E.W.; WILSON, M.E. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scand J Infect Dis**, v.36, n.6-7: p.443-449, 2004.

JERONIMO, S.M.B.; SOUSA, A.Q.; PEARSON, R.D.; *Leishmania* species: visceral (Kala-azar), cutaneous, and mucocutaneous leishmaniasis. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2005. p.3145-3156.

KHALIL, E. A.G.; ZIJLSTRA, E.E.; KAGER, P.A.; EL HASSAN, A.M. Epidemiology and clinical manifestations of *Leishmania donovani* infection in two villages in an endemic area in eastern Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, v.7, n.1: p.35-44, jan 2002.

KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S.; GAAFAR, A.; KURTZHALS, J.A.; EL HASSAN, A.M.; THEANDER, T.G.; KEMP, M. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunol Lett**, v.65, n.1-2: p.105-108, jan, 1999.

KUMAR, P.V.; DANESHBOD, Y.; SADEGHIPOOR, A. *Leishmania* in the glomerulus. **Arch Pathol Lab Med**, v.128, n.8: p.935-936, agosto, 2004.

KURKJIAN, K.M.; MAHMUTOVIC, A.J.; KELLAR, K.L.; HAQUE, R.; BERN, C.; SECOR, W.E. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. **Cytometry A**, v.69, n.5: p.353-358, maio, 2006.

LAGLER, H.; WILLHEIM, M.; TRAUNMÜLLER, 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**, v.57: p.291-295, 2003.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**, v.213, n.3-4: p377-387, 2008.

LOPEZ KOSTKA, S.; DINGES, S.; GRIEWANK, K.; IWAKURA, Y.; UDEY, M.C.; VON STEBUT, E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **J Immunol**, v.182, n.5: p.3039-3046, mar, 2009.

MATTHEWS, D.J.; EMSON, C.L.; MCKENZIE, G.J.; JOLIN, H.E.; BLACKWELL, J.M.; MCKENZIE, A.N. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. **Immunol**, v. 164, n.3: p.1458-1463, fev, 2000.

MOORE, K.W.; DE WALL-MALEFYT, R.; COFFMAN, R.I.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin -10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v.19: p.683-765, 2001.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol**, v.18, n.9: p.399-405, 2002.

MORENO, E.C.; MELO, M.N.; LAMBERTUCCI, J.R.; SERUFO, J.C.; ANDRADE, A.S.; ANTUNES, C.M.; GENARO, O.; CARNEIRO, M. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.39, n.5: p.421-427, set-out, 2006.

MURPHY, M.L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E.N.; HUNTER, C.A.; FARRELL, J.P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **Eur J Immunol**, v.31, n.10: p.2848-2856, out, 2001.

MURRAY, H.W.; JONATHAN, D.B.; CLIVE, R.D.; NANCY, G.S. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v.366, n. 9496: p. 1561-1577, outubro/novembro 2005.

NASCIMENTO, E.L.T.; MEDEIROS, I.M. Leishmaniose visceral (Calazar). In: TAVARES, W.; MARINHO, L.A.C. **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. São Paulo: Atheneu; 2005. p.706-713.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol**, v.28, n.9: p.378-384, set, 2007.

NYLÉN. S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; MANANDHAR, K.D.; SUNDAR, S.; SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **J Exp Méd**, v.204, n.4: p.805-817, abril, 2007.

OSMAN, O.F.; KAGER, P.A.; OSKAM, L. Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. **Trop Med Int Health**, v.5, n.8: p.553-562, 2000.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v.22, n.1: 1-13, jan, 1996.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARTINS-FILHO, O.A.; PRATA, A.; SILVA, L.A.; RABELLO, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FIGUEIREDO, R.M.; GUIMARÃES-CARVALHO, S.F.; FERRARI, T.C.; CORREA-OLIVEIRA, R. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scand J Immunol**, v.62, n.5: p.487-495, nov, 2005.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARTINS-FILHO, O.A.; PRATA, A.; SILVA L.A.; RABELLO, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FIGUEIREDO, R.M.; GUIMARÃES-CARVALHO, S.F.; FERRARI, T.C.; VAN WEYENBERGH, J.; CORREA-

OLIVEIRA, R. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clin Exp Immunol**, v.146, n.1: p124-132, out, 2006.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical AND Biological Research**, v. 31, n.1: p.143-148, 1998.

RIZOS, E.; DIMOS, G.; LIBEROPOULOS, E.N.; ELISAF, M.S.; DROSOS, A.A. Cryoglobulinemic purpura in visceral leishmaniasis. **Rheumatol Int**, v. 25, n.6: p.469-471, agosto, 2005.

ROBERTS, M.T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **Br Med Bull**, v.75-76, n.1: p.115-130, jul, 2006.

ROCHA, R.L. Leishmaniose visceral. In: ROCHA, M.O.C.; PEDROSO, E.R.P. **Fundamentos em infectologia**. Rio de Janeiro: Rubio, 2009. p.821-836.

RUIZ, J.H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v.29, n.12: p.671-678, dez, 2007.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.11: p.845-858, nov, 2002.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **J Vector Borne Dis**, v.45, n.4: p.255-272, dez, 2008.

SUNDAR, S.; SAHU, M.; MEHTA, H.; GUPTA, A.; KOHLI, U.; RAI, M.; BERMAN, J.D.; MURRAY, H.W. Noninvasive management of Indian visceral leishmaniasis:

clinical application of diagnosis by K39 antigen strip testing at a kala-azar referral unit. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n.5: p.581-586, set, 2002.

SUNDAR, S.; SINGH, R.K.; MAURYA, R.; KUMAR, B.; CHHABRA, A.; SINGH, V.; RAI, M. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100, n.6: p.533-537, jun, 2006.

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**, v.25, n.11-12: p.569-579, nov, 2003.

WEIGLE, K.; SARAIVIA, N.G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v.14, n.5: p.433-450, set-out, 1996.

WELCH, R.J.; ANDERSON, B.L.; LITWIN, C.M. Rapid immunochromatographic strip test for detection of anti-K39 immunoglobulin G antibodies for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol**, v.15, n.9: p.1483-1484, set, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – FORMULÁRIO DA PESQUISA

PROTOCOLO LEISHMANIOSE VISCERAL
--

Parte 1 - Identificação

1.1 Nome: _____	
1.2 Número de registro na pesquisa: _____	_ _ _
1.3 Número do prontuário PA: _____	_ _ _ _ _ _ _
1.4 Número do prontuário HC: _____	_ _ _ _ _ _ _
1.5 Data de Nascimento: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _
1.6 Idade completa em anos até a data da entrevista: _____	_ _
1.7 Município onde reside atualmente: _____ UF ____	_ _ _ _ _ _ _
1.8 Endereço: _____	_ _ _ _ _ _ _
1.9 Telefone: _____	_ _ _ _ _ _ _
1.10 Telefone: _____	_ _ _ _ _ _ _
1.11 Profissão: _____	_ _ _
1.12 Sexo: Masculino – 1 Feminino – 2	_
1.13 Naturalidade: _____ UF ____	_ _ _ _ _ _ _

Parte 2 – Diagnóstico

2.1 Teste rápido: Positivo – 1 Negativo – 2 Não realizado - 9	_
2.2 RIFI: Positivo – 1 Negativo – 2 Não realizado - 9	_
A - Título: _____	_ _ _ _
2.3 ELISA: Positivo – 1 Negativo – 2 Não realizado - 9	_
2.4 Mielograma: Positivo – 1 Negativo – 2 Não realizado - 9	_
A – Laudo: _____	

2.5 Cultura: Positivo – 1 Negativo – 2 Não realizado - 9	_

Parte 3 – Anamnese e Exame Físico	
3.1 1º sintoma: _____	_
3.2 Tempo do início dos sintomas (dias): _____	_ _ _
3.3 Número de atendimentos médicos prévios: _____	_ _
3.4 Contato com cães em domicílio: Sim – 1 Não – 2	_
3.5 Cão com diagnóstico prévio de calazar: Sim – 1 Não – 2	_
3.6 Peso anterior ao início dos sintomas: _____ Kg	_ _ _
3.7 Peso atual: _____ Kg	_ _ _
3.8 Febre: Sim – 1 Não – 2	_
3.9 Epistaxe: Sim – 1 Não – 2	_
3.10 Adinamia: Sim – 1 Não – 2	_
3.11 Hiporexia: Sim – 1 Não – 2	_
3.12 Dor abdominal: Sim – 1 Não – 2	_
3.13 Diarréia: Sim – 1 Não – 2	_
3.14 Hepatomegalia: Sim – 1 Não – 2	_
A – Distância Ax: _____ cm	_ _
B – Distância RCD: _____ cm	_ _
3.15 Esplenomegalia: Sim – 1 Não – 2	_
A – Distância RCE: _____ cm	_ _
B – Boyd: _____	_
3.16 Anemia: Sim – 1 Não – 2	_
A – Hb: _____	_ _ _
B – Ht: _____	_
3.17 Plaquetopenia: Sim – 1 Não – 2	_
A – Contagem de plaquetas: _____/mm ³	_ _ _ _ _ _ _
3.18 Leucopenia: Sim – 1 Não – 2	_
A – Contagem de leucócitos: _____/mm ³	_ _ _ _ _ _ _
3.19 Neutropenia: Sim – 1 Não – 2	_
A – Contagem de neutrófilos: _____/mm ³	_ _ _
3.20 Infecção prévia: Sim – 1 Não – 2	_

A – Qual: _____	_ _
3.21 Sangramentos (exceto epistaxe): Sim – 1 Não – 2	_
A – Qual: _____	_ _
3.22 Comorbidades: Sim – 1 Não – 2	_
A – Qual: _____	_ _
3.23 Outros: _____	
3.24 Duração da febre após início do tratamento (dias): _____	_ _

Parte 4 – Tratamento

4.1 Droga: _____	_
A – Dose diária: _____ mg/dia	_ _ _
B – Dose por peso: _____ mg/Kg/dia	_ _
C – Dose acumulada a suspensão da droga: _____	_ _ _ _
D – Data de início do uso: ___/___/_____	_ _ _ _ _ _ _ _
E – Data do término do uso: ___/___/_____	_ _ _ _ _ _ _ _
F – Tempo de uso: _____ dias	_ _
G – Via de administração: VO – 1 IM – 2 IV – 3	_
4.2 Droga: _____	_
A – Dose diária: _____ mg/dia	_ _ _
B – Dose por peso: _____ mg/Kg/dia	_ _
C – Dose acumulada a suspensão da droga: _____	_ _ _ _
D – Data de início do uso: ___/___/_____	_ _ _ _ _ _ _ _
E – Data do término do uso: ___/___/_____	_ _ _ _ _ _ _ _
F – Tempo de uso: _____ dias	_ _
G – Via de administração: VO – 1 IM – 2 IV – 3	_
4.3 Droga: _____	_
A – Dose diária: _____ mg/dia	_ _ _
B – Dose por peso: _____ mg/Kg/dia	_ _
C – Dose acumulada a suspensão da droga: _____	_ _ _ _
D – Data de início do uso: ___/___/_____	_ _ _ _ _ _ _ _
E – Data do término do uso: ___/___/_____	_ _ _ _ _ _ _ _
F – Tempo de uso: _____ dias	_ _
G – Via de administração: VO – 1 IM – 2 IV – 3	_

Parte 5 – Efeitos colaterais	
Data de início:	
5.1 Náusea/vômitos: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.2 Mialgia: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.3 Cefaleia: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.4 Anorexia: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.5 Artralgia: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.6 Dor abdominal: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.7 Palpitações: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.8 Parestesias: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.9 Febre: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.10 Rash: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.11 Alterações do paladar: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.12 Alterações comportamentais: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.13 Insuficiência renal: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.14 Pancreatite: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.15 Cardiotoxicidade: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.16 Distúrbio hidro-eletrolítico: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.17 Mielotoxicidade: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
5.18 Flebite: ____/____/____	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _

Parte 6 – Evolução	
6.1 Tempo de acompanhamento: _____ meses	_ _
6.2 Cura – 1 Óbito – 2 Recidiva – 3	_

Parte 7 – Exames complementares							
DATA							
Hb							
Ht							
Plaç							
Leucócitos							
Seg							
Bast							
Linf							
Eos							
Mono							
Baso							
At. Prot.							
RNI							
AST							
ALT							
FA							
GGT							
Bb D/I							
Alb./Glob.							
Amilase							
Lipase							
Ureia							
Creatinina							
LDH							
ECG							
QTc							
ST							
Eco							
US abdome							
Baço							
Fígado							
TC abdome							
Baço							
Fígado							

APÊNDICE B – CONSENTIMENTO ESCLARECIDO PARA ADULTOS

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esclarecimento e autorização para inclusão em protocolo de pesquisa para pacientes adultos com quadro clínico de leishmaniose visceral.

Pesquisadores: Dra. Regina Lunardi Rocha, Dr. Ricardo Luiz Fontes Moreira e Dra. Maria Vitória Assumpção Mourão.

Introdução: Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa denominada: “Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente”.

Antes de aceitar participar desta pesquisa é importante que você leia e entenda a explicação sobre tudo que será feito nesta pesquisa. Esta declaração descreve o objetivo, a coleta de sangue, benefícios, riscos, sigilo dos dados, e seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo.

Objetivo: Nosso objetivo é estudar a defesa do corpo em indivíduos com leishmaniose que desenvolveram sintomas da doença e naqueles que tiveram contato com o parasita que causa a leishmaniose (*Leishmania chagasi*), mas não desenvolveram a doença.

Procedimentos: Para que você participe do nosso estudo é preciso que você tenha leishmaniose visceral e ainda não tenha iniciado tratamento específico. Não existe restrição de cor de pele, sexo ou idade.

Nosso grupo colherá a história da sua doença, realizará o exame físico e colherá duas amostras de sangue (6 mL cada – aproximadamente 2 colheres de café) para realização em laboratório dos exames investigados nesta pesquisa. A primeira amostra de sangue será colhida antes do início do tratamento e a segunda após o término do tratamento específico.

Riscos: A técnica para coleta de sangue é idêntica à técnica utilizada para outros exames de sangue comuns. Os riscos são mínimos para você, podendo surgir pequeno hematoma (mancha roxa) e dor leve momentânea no local da punção. Caso você tenha qualquer problema depois da punção da coleta de sangue para a pesquisa, será tratado prontamente pela equipe do estudo.

Danos: No caso de você apresentar alguma reação durante a realização do estudo, deverá entrar em contato com os médicos responsáveis pelo estudo: Dra. Regina Lunardi nos telefones 9992-6773 e 3223-6773 ou Dr. Ricardo Moreira nos telefones 9189-5624 e 3423-7007 ou Dra. Maria Vitória nos telefones 3335-8970 ou 9177-7035 e receberá todos os cuidados médicos necessários providos pelo Hospital das Clínicas da UFMG ou pelo Hospital Infantil João Paulo II da FHEMIG. Você não abrirá mão de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento esclarecido.

Benefícios: Não haverá benefício pessoal imediato da sua participação na pesquisa.

Confidencialidade: Todos os dados obtidos serão utilizados para o seu acompanhamento e com a finalidade da pesquisa. O sangue colhido será utilizado para esta pesquisa e caso reste algum sangue após nossas análises, o mesmo será armazenado para possíveis estudos futuros, nos quais será novamente solicitado seu consentimento. Seu nome não será usado diretamente e será mantido em sigilo até onde é permitido por lei. O pesquisador e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa das instituições participantes poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará.

Desligamento: A sua participação neste estudo é voluntária e você não deixará de receber cuidados ou tratamento em caso de recusa para participar da pesquisa. Você poderá desistir da participação

em qualquer momento, sem interrupção da assistência que vem sendo prestada. Sua participação nesta pesquisa também poderá ser finalizada se forem identificadas outras causas de doença que não a leishmaniose ou se o programa for cancelado.

Compensação: Você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

Contatos: Em caso de dúvidas, em qualquer momento da pesquisa, você poderá entrar em contato com a equipe responsável:

Dra. Regina Lunardi: 9992-6773 e 3223-6773

Dr. Ricardo Moreira: 9189-5624 e 3423-7007

Dra. Maria Vitória: 9177-7035 e 3335-8970

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG): Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II – 2º andar, Campus Pampulha, Belo Horizonte – MG, CEP 31270-901. Telefone: 3409-4592.

Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMIG: 3239-9552.

Termo de consentimento:

Eu, _____, declaro que fui bem informado (a) a respeito da pesquisa “Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente”. Tive a oportunidade de fazer perguntas e ter respostas as minhas dúvidas a respeito do estudo. Estou ciente que os riscos da coleta de sangue são muito pequenos, que as informações obtidas são sigilosas e somente serão utilizadas em meu benefício e para os fins da pesquisa e caso reste algum sangue coletado nesta pesquisa, o mesmo será armazenado para possíveis estudos posteriores. Assino este termo de consentimento voluntariamente e recebo uma cópia assinada do mesmo, até que eu decida o contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____.

Paciente

Testemunha

Pesquisador

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esclarecimento e autorização para inclusão em protocolo de pesquisa para responsável legal por paciente menor de idade (até 6 anos) com quadro clínico de leishmaniose visceral.

Pesquisadores: Dra. Regina Lunardi Rocha, Dr. Ricardo Luiz Fontes Moreira e Dra. Maria Vitória Assumpção Mourão.

Introdução: O menor sob sua responsabilidade está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa denominada: “Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente”.

Antes de aceitar participar desta pesquisa é importante que você leia e entenda a explicação sobre tudo que será feito nesta pesquisa. Esta declaração descreve o objetivo, a coleta de sangue, benefícios, riscos, sigilo dos dados, e seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo.

Objetivo: Nosso objetivo é estudar a defesa do corpo em indivíduos com leishmaniose que desenvolveram sintomas da doença e naqueles que tiveram contato com o parasita que causa a leishmaniose (*Leishmania chagasi*), mas não desenvolveram a doença.

Procedimentos: Para que o menor participe do nosso estudo é preciso que ele tenha leishmaniose visceral e ainda não tenha iniciado tratamento específico. Não existe restrição de cor de pele, sexo ou idade.

Nosso grupo colherá a história da doença, realizará o exame físico e colherá duas amostras de sangue (6 mL cada – aproximadamente 2 colheres de café) para realização em laboratório dos exames investigados nesta pesquisa. A primeira amostra de sangue será colhida antes do início do tratamento e a segunda após o término do tratamento específico.

Riscos: A técnica para coleta de sangue é idêntica à técnica utilizada para outros exames de sangue comuns. Os riscos são mínimos para o menor, podendo surgir pequeno hematoma (mancha roxa) e dor leve momentânea no local da punção. Caso ele tenha qualquer problema depois da punção da coleta de sangue para a pesquisa, será tratado prontamente pela equipe do estudo.

Danos: No caso do menor apresentar alguma reação durante a realização do estudo, você deverá entrar em contato com os médicos responsáveis pelo estudo: Dra. Regina Lunardi nos telefones 9992-6773 e 3223-6773 ou Dr. Ricardo Moreira nos telefones 9189-5624 e 3423-7007 ou Dra. Maria Vitória nos telefones 3335-8970 ou 9177-7035 e ele receberá todos os cuidados médicos necessários providos pelo Hospital das Clínicas da UFMG ou pelo Hospital Infantil João Paulo II da FHEMIG. Você não abrirá mão de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento esclarecido.

Benefícios: Não haverá benefício pessoal imediato da participação na pesquisa.

Confidencialidade: Todos os dados obtidos serão utilizados para o acompanhamento do menor e com a finalidade da pesquisa. O sangue colhido será utilizado para esta pesquisa e caso reste algum sangue após nossas análises, o mesmo será armazenado para possíveis estudos futuros, nos quais será novamente solicitado seu consentimento. O nome do menor não será usado diretamente e será mantido em sigilo até onde é permitido por lei. O pesquisador e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa das instituições participantes poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará.

Desligamento: A participação neste estudo é voluntária e o menor não deixará de receber cuidados ou tratamento em caso de recusa para participar da pesquisa. Você poderá desistir da participação em qualquer momento, sem interrupção da assistência que vem sendo prestada. A participação nesta pesquisa também poderá ser finalizada se forem identificadas outras causas de doença que não a leishmaniose ou se o programa for cancelado.

Compensação: Você ou o menor sob sua responsabilidade não receberão qualquer compensação financeira pela participação no estudo.

Contatos: Em caso de dúvidas, em qualquer momento da pesquisa, você poderá entrar em contato com a equipe responsável:

Dra. Regina Lunardi: 9992-6773 e 3223-6773

Dr. Ricardo Moreira: 9189-5624 e 3423-7007

Dra. Maria Vitória: 9177-7035 e 3335-8970

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG): Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II – 2º andar, Campus Pampulha, Belo Horizonte – MG, CEP 31270-901. Telefone: 3409-4592.

Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMIG: 3239-9552.

Termo de consentimento:

Eu, _____, responsável legal pelo(a) menor _____, declaro que fui bem informado(a) a respeito da pesquisa “Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente”. Tive a oportunidade de fazer perguntas e ter respostas as minhas dúvidas a respeito do estudo. Estou ciente que os riscos da coleta de sangue são muito pequenos, que as informações obtidas são sigilosas e somente serão utilizadas em benefício do menor e para os fins da pesquisa e caso reste algum sangue coletado nesta pesquisa, o mesmo será armazenado para possíveis estudos posteriores. Assino este termo de consentimento voluntariamente e recebo uma cópia assinada do mesmo, até que eu decida o contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____.

Responsável legal pelo paciente

Testemunha

Pesquisador

APÊNDICE D – CONSENTIMENTO ESCLARECIDO RESPONSÁVEL E MENOR ENTRE 7 E 12 ANOS

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esclarecimento e autorização para inclusão em protocolo de pesquisa para responsável legal e paciente menor de idade (entre 7 e 12 anos) com quadro clínico de leishmaniose visceral.

Pesquisadores: Dra. Regina Lunardi Rocha, Dr. Ricardo Luiz Fontes Moreira e Dra. Maria Vitória Assumpção Mourão.

Introdução: Você responsável e o menor sob sua responsabilidade estão sendo convidados(as) a participar de uma pesquisa denominada: “Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente”.

Antes de aceitarem participar desta pesquisa é importante que vocês leiam e entendam a explicação sobre tudo que será feito nesta pesquisa. Esta declaração descreve o objetivo, a coleta de sangue, benefícios, riscos, sigilo dos dados, e seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo.

Objetivo: Nosso objetivo é estudar a defesa do corpo em indivíduos com leishmaniose que desenvolveram sintomas da doença e naqueles que tiveram contato com o parasita que causa a leishmaniose (*Leishmania chagasi*), mas não desenvolveram a doença.

Procedimentos: Para que o menor participe do nosso estudo é preciso que ele tenha leishmaniose visceral e ainda não tenha iniciado tratamento específico. Não existe restrição de cor de pele, sexo ou idade.

Nosso grupo colherá a história da doença, realizará o exame físico e colherá duas amostras de sangue (6 mL cada – aproximadamente 2 colheres de café) para realização em laboratório dos exames investigados nesta pesquisa. A primeira amostra de sangue será colhida antes do início do tratamento e a segunda após o término do tratamento específico.

Riscos: A técnica para coleta de sangue é idêntica à técnica utilizada para outros exames de sangue comuns. Os riscos são mínimos para o menor, podendo surgir pequeno hematoma (mancha roxa) e dor leve momentânea no local da punção. Caso ele tenha qualquer problema depois da punção da coleta de sangue para a pesquisa, será tratado prontamente pela equipe do estudo.

Danos: No caso do menor apresentar alguma reação durante a realização do estudo, vocês deverão entrar em contato com os médicos responsáveis pelo estudo: Dra. Regina Lunardi nos telefones 9992-6773 e 3223-6773 ou Dr. Ricardo Moreira nos telefones 9189-5624 e 3423-7007 ou Dra. Maria Vitória nos telefones 3335-8970 ou 9177-7035 e ele receberá todos os cuidados médicos necessários providos pelo Hospital das Clínicas da UFMG ou pelo Hospital Infantil João Paulo II da FHEMIG. Vocês não abrirão mão de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento esclarecido.

Benefícios: Não haverá benefício pessoal imediato da participação na pesquisa.

Confidencialidade: Todos os dados obtidos serão utilizados para o acompanhamento do menor e com a finalidade da pesquisa. O sangue colhido será utilizado para esta pesquisa e caso reste algum sangue após nossas análises, o mesmo será armazenado para possíveis estudos futuros, nos quais será novamente solicitado seu consentimento. O nome do menor não será usado diretamente e será mantido em sigilo até onde é permitido por lei. O pesquisador e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa das instituições participantes poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará.

Desligamento: A participação neste estudo é voluntária e o menor não deixará de receber cuidados ou tratamento em caso de recusa para participar da pesquisa. Vocês poderão desistir da participação em qualquer momento, sem interrupção da assistência que vem sendo prestada. A participação nesta pesquisa também poderá ser finalizada se forem identificadas outras causas de doença que não a leishmaniose ou se o programa for cancelado.

Compensação: Você ou o menor sob sua responsabilidade não receberão qualquer compensação financeira pela participação no estudo.

Contatos: Em caso de dúvidas, em qualquer momento da pesquisa, vocês poderão entrar em contato com a equipe responsável:

Dra. Regina Lunardi: 9992-6773 e 3223-6773

Dr. Ricardo Moreira: 9189-5624 e 3423-7007

Dra. Maria Vitória: 9177-7035 e 3335-8970

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG): Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II – 2º andar, Campus Pampulha, Belo Horizonte – MG, CEP 31270-901. Telefone: 3409-4592.

Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMIG: 3239-9552.

Termo de consentimento:

Eu, _____, responsável legal pelo(a) menor _____, e eu, _____, o menor, declaramos que fomos bem informados(as) a respeito da pesquisa “Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente”. Tivemos a oportunidade de fazer perguntas e ter respostas as nossas dúvidas a respeito do estudo. Estamos ciente que os riscos da coleta de sangue são muito pequenos, que as informações obtidas são sigilosas e somente serão utilizadas em benefício do menor e para os fins da pesquisa e caso reste algum sangue coletado nesta pesquisa, o mesmo será armazenado para possíveis estudos posteriores. Assinamos este termo de consentimento voluntariamente e recebemos uma cópia assinada do mesmo, até que decidamos o contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____.

Responsável legal pelo paciente

Paciente (menor entre 7 e 12 anos de idade)

Testemunha

Pesquisador

APÊNDICE E – CONSENTIMENTO ESCLARECIDO RESPONSÁVEL

MENOR ENTRE 13 e 17 ANOS

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esclarecimento e autorização para inclusão em protocolo de pesquisa para responsável legal por paciente menor de idade (entre 13 e 17 anos) com quadro clínico de leishmaniose visceral.

Pesquisadores: Dra. Regina Lunardi Rocha, Dr. Ricardo Luiz Fontes Moreira e Dra. Maria Vitória Assumpção Mourão.

Introdução: O menor sob sua responsabilidade está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa denominada: “Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente”.

Antes de aceitar participar desta pesquisa é importante que você leia e entenda a explicação sobre tudo que será feito nesta pesquisa. Esta declaração descreve o objetivo, a coleta de sangue, benefícios, riscos, sigilo dos dados, e seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo.

Objetivo: Nosso objetivo é estudar a defesa do corpo em indivíduos com leishmaniose que desenvolveram sintomas da doença e naqueles que tiveram contato com o parasita que causa a leishmaniose (*Leishmania chagasi*), mas não desenvolveram a doença.

Procedimentos: Para que o menor participe do nosso estudo é preciso que ele tenha leishmaniose visceral e ainda não tenha iniciado tratamento específico. Não existe restrição de cor de pele, sexo ou idade.

Nosso grupo colherá a história da doença, realizará o exame físico e colherá duas amostras de sangue (6 mL cada – aproximadamente 2 colheres de café) para realização em laboratório dos exames investigados nesta pesquisa. A primeira amostra de sangue será colhida antes do início do tratamento e a segunda após o término do tratamento específico.

Riscos: A técnica para coleta de sangue é idêntica à técnica utilizada para outros exames de sangue comuns. Os riscos são mínimos para o menor, podendo surgir pequeno hematoma (mancha roxa) e dor leve momentânea no local da punção. Caso ele tenha qualquer problema depois da punção da coleta de sangue para a pesquisa, será tratado prontamente pela equipe do estudo.

Danos: No caso do menor apresentar alguma reação durante a realização do estudo, você deverá entrar em contato com os médicos responsáveis pelo estudo: Dra. Regina Lunardi nos telefones 9992-6773 e 3223-6773 ou Dr. Ricardo Moreira nos telefones 9189-5624 e 3423-7007 ou Dra. Maria Vitória nos telefones 3335-8970 ou 9177-7035 e ele receberá todos os cuidados médicos necessários providos pelo Hospital das Clínicas da UFMG ou pelo Hospital Infantil João Paulo II da FHEMIG. Você não abrirá mão de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento esclarecido.

Benefícios: Não haverá benefício pessoal imediato da participação na pesquisa.

Confidencialidade: Todos os dados obtidos serão utilizados para o acompanhamento do menor e com a finalidade da pesquisa. O sangue colhido será utilizado para esta pesquisa e caso reste algum sangue após nossas análises, o mesmo será armazenado para possíveis estudos futuros, nos quais será novamente solicitado seu consentimento. O nome do menor não será usado diretamente e será mantido em sigilo até onde é permitido por lei. O pesquisador e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa das instituições participantes poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará.

Desligamento: A participação neste estudo é voluntária e o menor não deixará de receber cuidados ou tratamento em caso de recusa para participar da pesquisa. Você poderá desistir da participação em qualquer momento, sem interrupção da assistência que vem sendo prestada. A participação nesta pesquisa também poderá ser finalizada se forem identificadas outras causas de doença que não a leishmaniose ou se o programa for cancelado.

Compensação: Você ou o menor sob sua responsabilidade não receberão qualquer compensação financeira pela participação no estudo.

Contatos: Em caso de dúvidas, em qualquer momento da pesquisa, você poderá entrar em contato com a equipe responsável:

Dra. Regina Lunardi: 9992-6773 e 3223-6773

Dr. Ricardo Moreira: 9189-5624 e 3423-7007

Dra. Maria Vitória: 9177-7035 e 3335-8970

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG): Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II – 2º andar, Campus Pampulha, Belo Horizonte – MG, CEP 31270-901. Telefone: 3409-4592.

Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMIG: 3239-9552.

Termo de consentimento:

Eu, _____, responsável legal pelo(a) menor _____, declaro que fui bem informado(a) a respeito da pesquisa “Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente”. Tive a oportunidade de fazer perguntas e ter respostas as minhas dúvidas a respeito do estudo. Estou ciente que os riscos da coleta de sangue são muito pequenos, que as informações obtidas são sigilosas e somente serão utilizadas em benefício do menor e para os fins da pesquisa e caso reste algum sangue coletado nesta pesquisa, o mesmo será armazenado para possíveis estudos posteriores. Assino este termo de consentimento voluntariamente e recebo uma cópia assinada do mesmo, até que eu decida o contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____.

Responsável legal pelo paciente

Testemunha

Pesquisador

APÊNDICE F – CONSENTIMENTO ESCLARECIDO MENOR ENTRE 13 E 17 ANOS CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esclarecimento e autorização para inclusão em protocolo de pesquisa para menor de idade (entre 13 e 17 anos), alfabetizado, com quadro clínico de leishmaniose visceral.

Pesquisadores: Dra. Regina Lunardi Rocha, Dr. Ricardo Luiz Fontes Moreira e Dra. Maria Vitória Assumpção Mourão.

Introdução: Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa denominada: “Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente”.

Antes de aceitar participar desta pesquisa é importante que você leia e entenda a explicação sobre tudo que será feito nesta pesquisa. Esta declaração descreve o objetivo, a coleta de sangue, benefícios, riscos, sigilo dos dados, e seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo.

Objetivo: Nosso objetivo é estudar a defesa do corpo em indivíduos com leishmaniose que desenvolveram sintomas da doença e naqueles que tiveram contato com o parasita que causa a leishmaniose (*Leishmania chagasi*), mas não desenvolveram a doença.

Procedimentos: Para que você participe do nosso estudo é preciso que você tenha leishmaniose visceral e ainda não tenha iniciado tratamento específico. Não existe restrição de cor de pele, sexo ou idade.

Nosso grupo colherá a história da sua doença, realizará o exame físico e colherá duas amostras de sangue (6 mL cada – aproximadamente 2 colheres de café) para realização em laboratório dos exames investigados nesta pesquisa. A primeira amostra de sangue será colhida antes do início do tratamento e a segunda após o término do tratamento específico.

Riscos: A técnica para coleta de sangue é idêntica à técnica utilizada para outros exames de sangue comuns. Os riscos são mínimos para você, podendo surgir pequeno hematoma (mancha roxa) e dor leve momentânea no local da punção. Caso você tenha qualquer problema depois da punção da coleta de sangue para a pesquisa, será tratado prontamente pela equipe do estudo.

Danos: No caso de você apresentar alguma reação durante a realização do estudo, deverá entrar em contato com os médicos responsáveis pelo estudo: Dra. Regina Lunardi nos telefones 9992-6773 e 3223-6773 ou Dr. Ricardo Moreira nos telefones 9189-5624 e 3423-7007 ou Dra. Maria Vitória nos telefones 3335-8970 ou 9177-7035 e receberá todos os cuidados médicos necessários providos pelo Hospital das Clínicas da UFMG ou pelo Hospital Infantil João Paulo II da FHEMIG. Você não abrirá mão de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento esclarecido.

Benefícios: Não haverá benefício pessoal imediato da sua participação na pesquisa.

Confidencialidade: Todos os dados obtidos serão utilizados para o seu acompanhamento e com a finalidade da pesquisa. O sangue colhido será utilizado para esta pesquisa e caso reste algum sangue após nossas análises, o mesmo será armazenado para possíveis estudos futuros, nos quais será novamente solicitado seu consentimento. Seu nome não será usado diretamente e será mantido em sigilo até onde é permitido por lei. O pesquisador e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa das instituições participantes poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará.

Desligamento: A sua participação neste estudo é voluntária e você não deixará de receber cuidados ou tratamento em caso de recusa para participar da pesquisa. Você poderá desistir da participação

em qualquer momento, sem interrupção da assistência que vem sendo prestada. Sua participação nesta pesquisa também poderá ser finalizada se forem identificadas outras causas de doença que não a leishmaniose ou se o programa for cancelado.

Compensação: Você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

Contatos: Em caso de dúvidas, em qualquer momento da pesquisa, você poderá entrar em contato com a equipe responsável:

Dra. Regina Lunardi: 9992-6773 e 3223-6773

Dr. Ricardo Moreira: 9189-5624 e 3423-7007

Dra. Maria Vitória: 9177-7035 e 3335-8970

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG): Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II – 2º andar, Campus Pampulha, Belo Horizonte – MG, CEP 31270-901. Telefone: 3409-4592.

Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMIG: 3239-9552.

Termo de consentimento:

Eu, _____, declaro que fui bem informado (a) a respeito da pesquisa “Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente”. Tive a oportunidade de fazer perguntas e ter respostas as minhas dúvidas a respeito do estudo. Estou ciente que os riscos da coleta de sangue são muito pequenos, que as informações obtidas são sigilosas e somente serão utilizadas em meu benefício e para os fins da pesquisa e caso reste algum sangue coletado nesta pesquisa, o mesmo será armazenado para possíveis estudos posteriores. Assino este termo de assentimento voluntariamente e recebo uma cópia assinada do mesmo, até que eu decida o contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____.

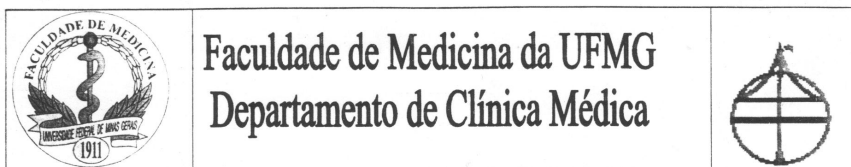
Paciente (menor entre 13 e 17 anos de idade)

Testemunha

Pesquisador

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA DA UFMG




PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E
MEDICINA TROPICAL
PROJETO DE MESTRADO

ALUNO: Ricardo Luiz Fontes Moreira
ORIENTADORA: Profa. Dra. Regina Lunardi Rocha

Este projeto "*Resposta imunológica na Leishmaniose Visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na Leishmaniose Visceral Inaparente*" foi aprovado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, conforme parecer anexo, datado de 16/09/08. Assim fica ratificada sua aprovação pelo Departamento de Clínica Médica para posterior encaminhamento ao COEP/UFMG.

Belo Horizonte, 16 de setembro de 2008.


Prof. José Carlos Brito da Silveira
Chefe do Departamento de Clínica Médica
Insc. UFMG 27836-3

ANEXO B – PARECER DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA DA UFMG**CÂMARA DO DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA
PARECER Nº 74/2008****TÍTULO DO PROJETO:**

RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CLINICAMENTE MANIFESTA PRÉ E PÓS TRATAMENTO E NA LEISHMANIOSE VISCERAL INAPARENTE

INTERESSADOS:

Profa. Regina Lunardi Rocha (orientadora)
Ricardo Luiz Fontes Moreira (mestrando)

HISTÓRICO:

A Leishmaniose visceral é doença prevalente em nosso meio, inclusive com relatos de significativo aumento de sua incidência em Belo Horizonte e região metropolitana, o que justifica novos estudos para aperfeiçoar seu diagnóstico e melhorar o entendimento dos diversos aspectos clínicos. O presente estudo tem como objetivo estudar o padrão de resposta imunológica entre indivíduos que manifestam sinais e sintomas da doença antes e após o tratamento específico e, também, a resposta imunológica nos indivíduos que apesar de infectados não manifestaram sintomas.

MÉRITO:

Trata-se de um estudo de coorte com indivíduos com diagnóstico de leishmaniose visceral, clinicamente manifesta ou assintomáticos, para avaliar, por meio da citometria de fluxo, a resposta imunológica antes e após o tratamento. Os critérios de inclusão e exclusão estão bem estabelecidos. A introdução e a justificativa da pesquisa estão bem fundamentadas em extensa revisão da literatura, apresentando significativa lista de referências. A metodologia está bem explicitada e adequada aos objetivos do estudo. Os pesquisadores afirmam que não haverá custo adicional para as instituições onde será realizada a pesquisa, pois o único exame fora da rotina do serviço terá seus custos assumidos pelos próprios.

Quanto à questão ética, os pesquisadores garantem a participação voluntária e assumem o compromisso de divulgar os resultados sejam eles favoráveis ou não, preservando o sigilo em relação à identificação dos indivíduos avaliados e assumindo riscos mínimos aos participantes, uma vez que será realizada apenas uma coleta de amostra sanguínea por pessoal bem treinado. Declaram não haver nenhum conflito de interesse com qualquer instituição. Em anexo foram apresentados seis modelos de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, dirigidos aos participantes adultos, para crianças alfabetizadas e para os responsáveis pelas crianças menores de idade, específicos para os grupos com e sem sintomatologia aparente, que, salvo melhor juízo, estão de acordo com o que preconiza a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

CONCLUSÃO: Diante do exposto, consideramos o projeto relevante e exequível, sendo pela sua aprovação sem ressalvas. É relevante citar que o projeto em tela já foi também aprovado pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical.

Belo Horizonte, 05/11/2008

Prof. Eduardo Carlos Tavares
Relator



Aprova o parecer do relator

em 07/11/08

M. Aparecida Martins

Maria Aparecida Martins
chefe do Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG


ANEXO C – PARECER UNIDADE FUNCIONAL PRONTO ATENDIMENTO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG

 Unidade Funcional Pronto Atendimento		MEMORANDO		 GESQUALIS <small>GESTÃO PELA QUALIDADE EM SAÚDE</small>
Data da Emissão: 29/10/08	N.º do memorando: 00070/08	Código: 113201	Página: 1/1	
De: Dra. Paula Martins Gerente UFPA Para: Assunto: Parecer Projeto de Pesquisa “Resposta imunológica na leishmaniose visceral inaparente”				

Prezado Senhor,

Atendendo a solicitação do mestrando Dr. Ricardo Luiz Fontes Moreira, autorizamos a realização do Projeto de Pesquisa “resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós-tratamento e leishmaniose visceral inaparente”, nas dependências físicas do Pronto Atendimento, estando o mesmo sob a orientação da professora Dra. Regina Lunard Rocha.

Atenciosamente,


Dra. Paula Martins
Paula Martins
Coordenação Médica P.A.
HC/UFMG

ANEXO D – PARECER UNIDADE FUNCIONAL PEDIATRIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG



*Unidade Funcional Pediatria
Hospital das Clínicas
Universidade Federal de Minas Gerais*

ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA

Título do Projeto:

“Resposta Imunológica na Leishmaniose Visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na Leishmaniose visceral inaparente.”

Orientadora:

Dra. Regina Lunardi Rocha

Pesquisador Responsável:


Ricardo Luiz Fontes Moreira

Recomendações/restrições para o desenvolvimento da pesquisa:

O objetivo do projeto é avaliar o padrão de resposta imunológica em indivíduos com Leishmaniose visceral sintomática e assintomática antes e depois do tratamento específico. O projeto é relevante, bem fundamentado teoricamente e não oferece riscos aos pacientes.

O projeto foi aprovado por unanimidade por esse Colegiado.

31 de Outubro de 2008.


Cláudia Conzalez Cunha
Gerente da U. F. Pediatria HC-UFMG

ANEXO E – PARECER UNIDADE FUNCIONAL CLÍNICA MÉDICA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Parecer da Unidade Funcional de Clínica Médica
Comissão de pesquisa

Nome do Projeto: `Resposta imunológica na Leishmaniose Visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na Leishmaniose Visceral inaparente`

Local: Hospital das Clínicas, unidades de internação sétimo andar e terceiro andar, ala sul.

Autor principal: Ricardo Luiz Fontes Moreira

Descrição breve do projeto: O projeto tem por objetivo estudar a de fesa do corpo em indivíduos com leishmaniose visceral que desenvolveram sintomas da doença e naqueles que tiveram contato com o parasita que causa a leishmaniose, mas não desenvolveram a doença.

Sugestões/esclarecimentos O projeto de pesquisa trata de questões de uma infecção importante no nosso meio, trazendo subsídios para se avaliar o que leva, ou contribui, para que uns pacientes desenvolvam a doença e outros não, não sendo suficiente, portanto, apenas a presença do parasita. Considerando a posição do Hospital das Clínicas na rede, a pesquisa poderá contribuir para que o processo de adoecimento das pessoas na sociedade seja melhor compreendido.

Conclusão:

1. **Aprovado sem ressalvas (X)**

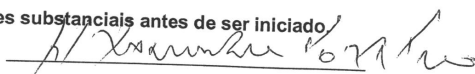
Poderá ser iniciado imediatamente.

2. **Aprovado com ressalvas ()**

Poderá ser iniciado, mas os esclarecimentos deverão ser encaminhados para UFCLM, no máximo em uma semana para aprovação definitiva, sob pena de não aprovação.

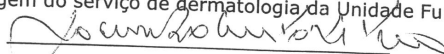
3. **Não aprovado ()**

necessita de modificações substanciais antes de ser iniciado.



Vera Lúcia de Araújo Nogueira Lima

Coordenadora de enfermagem do serviço de dermatologia da Unidade Funcional Clínica Médica



Jose Roberto Siqueira Castro – Gerente da Unidade Funcional Clínica Médica

Belo Horizonte, 31 de outubro de 2008.

ANEXO F – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FHEMIG**FHEMIG**
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO
ESTADO DE MINAS GERAIS**PARECER Nº123/08**

Registro CEP/FHEMIG: 123/08 (este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0103.0.287.203-08
Data: 20/11/2008

Hospital Infantil João Paulo II**Pesquisador Responsável: Regina Lunardi Rocha****DECISÃO:**

O Comitê de Ética em Pesquisa, (CEP/FHEMIG), **aprova** no dia 13 de Novembro de 2008 o projeto de pesquisa intitulado: « “Resposta Imunológica na Leishmaniose Visceral Clinicamente Manifesta, Pré e Pós Tratamento, e na Leishmaniose Visceral Inaparente” ».

Relatórios parciais e finais devem ser encaminhados ao CEP/FHEMIG com um intervalo mínimo de seis meses (entre os relatórios), a partir da data de início da pesquisa.

- Formulário CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – deverá ser assinado, pelo pesquisador responsável, nos espaços apropriados, e em seguida o NEP deverá encaminhar a este CEP/FHEMIG 02 (duas) vias devidamente assinadas, enquanto que a outra deverá ser entregue ao pesquisador responsável.


Vanderson Assis Romualdo**Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

ANEXO G – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 103.0.287.203/08

Interessado(a): Profa. Regina Lunardi Rocha
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Faculdade - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 15 de janeiro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO H – FOLHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640

**DECLARAÇÃO**

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Regina Lunardi Rocha, Enio Roberto Pietra Pedroso e Lis Ribeiro do Valle Antonelli, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“ESTUDO FENOTÍPICO DAS SUBPOPLAÇÕES DE LINFÓCITOS T E MONÓCITOS, ESTIMULADOS OU NÃO COM ANTÍGENO SOLÚVEL DE LEISHMANIA, EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL PRÉ E PÓS- TRATAMENTO ESPECÍFICO”** apresentada pelo mestrando **RICARDO LUIZ FONTES MOREIRA** para obtenção do título de mestre em Infectologia e Medicina Tropical, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 04 de setembro de 2009.

Profa. Regina Lunardi Rocha
Orientadora

Prof. Enio Roberto Pietra Pedroso

Profa. Lis Ribeiro do Valle Antonelli