



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MÉRCIA SINDEAUX FRUTUOSO

MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA IN VITRO À *Leishmania chagasi* EM
INDIVÍDUOS BAIXOS PRODUTORES DE IFN- γ

FORTALEZA-CEARÁ

2009

MÉRCIA SINDEAUX FRUTUOSO

MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA IN VITRO À *Leishmania chagasi* EM
INDIVÍDUOS BAIXOS PRODUTORES DE IFN- γ

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação
em Patologia da Universidade Federal do Ceará para
obtenção do título de Mestre em Patologia

Orientadora: Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu
Co-orientação: Dra. Maria do Livramento Leitão
Vilar.

FORTALEZA-CEARÁ

2009

F964m Frutuoso, Mércia Sindeaux

Modulação da resposta imunológica in vitro à *Leishmania chagasi* em indivíduos baixos produtores de IFN- γ / Mércia Sindeaux Frutuoso. – Fortaleza, 2009.

113 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza-Ce, 2009

1. Leishmania 2. Peptídeos e proteínas de sinalização intracelular 3. Interferon gama I. Pompeu, Margarida Maria de Lima (orient.) II. Título

CDD: 616.9364

MÉRCIA SINDEAUX FRUTUOSO

*MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA IN VITRO À Leishmania chagasi EM
INDIVÍDUOS BAIXOS PRODUTORES DE IFN- γ*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Patologia

Aprovada em 26 de Agosto de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profª Dra. Margarida Maria de L. Pompeu (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Profª Dra. Diana Célia Sousa Nunes- Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará-UECE

Profª Dra. Erika Freitas Mota
Universidade Federal do Ceará-UFC

Profª Dr. Max Victor Carioca Freitas
Universidade Federal do Ceará-UFC

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado por toda a vida.

Aos meus pais que foram e são as pessoas mais importantes da minha vida, sempre presentes em todos os momentos e tudo que sou hoje veio da educação, carinho e amor deles por mim. Minha mãe, Carmem Lucia Martins Sindeaux Frutuoso, dedicou-se aos filhos sempre com muito amor e carinho, abandonando os próprios sonhos e sua carreira profissional para ver seus filhos com um futuro promissor, nos ensinou a lutar pelos sonhos, a ter caráter e principalmente nos ensinou a importância do respeito ao próximo. Meu Pai, Juarez Frutuoso da Silva, trabalhou muito e longe da família para nos proporcionar a vida que tínhamos, um amigo que sempre com o seu jeito me dava os melhores conselhos e sempre me apoiava em minhas decisões. Essas duas pessoas tão simples e honestas são um espelho pra minha vida e as pessoas que mais amo e que mais tenho que agradecer.

A António Alves de Lima (mais conhecido como Airton), meu esposo, dedicado, amoroso e extremamente paciente, que conviveu com todo meu estresse, no qual só ele suportaria estar perto de mim, e ele sempre estava. Dividimos momentos maravilhosos e momentos muito difíceis na etapa final desse trabalho. É com muito amor que o agradeço por tudo que fez e faz por mim. Obrigada por todo amor, presença e dedicação. Te amo!!!!

À Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu, que mereceria muitas páginas de agradecimento dedicadas somente a ela, uma pessoa admirada por todos a sua volta, por ser sempre dedicada ao trabalho é para mim o exemplo de como um bom profissional deve ser, a sua humildade faz com que cada aluno seu não a tema e sim a respeite, com seu carinho e respeito me fez acreditar e confiar que eu seria capaz de ir até onde eu desejasse. Obrigada por ter me dado a oportunidade de aprender tudo que sei, por ter confiado tanto em mim, pelo apoio nos piores momentos da minha vida e por estar presente nos melhores momentos dela. Obrigada por me tratar como uma filha, e é com o sentimento de filha que espero e luto para nunca decepcionar minha mãe.

À Dra. Maria do Livramento Leitão Vilar, por ser acima de tudo, uma mãezona, que não mediu esforços para conclusão desse trabalho. Ensinou-me a ter calma (muita, muita

calma), dedicação, e principalmente, me fez ler e escrever muito. Foram estas leituras que facilitaram a elaboração desse trabalho e a escrita que diminuiu meu medo de escrever. Sua determinação permitiu anos fantásticos de convivência, que possibilitaram a observação de todas as qualidades e alguns pequenos defeitinhos, como ser parecida com a Juliana na teimosia. Sou grata pelo carinho e atenção a mim dedicados. Amo você Mãezinha!

À Érika Mota, por acreditar em mim, por me ensinar o valor e importância da pesquisa de forma crítica, sempre com muita dedicação e alguns gritinhos (risos). Uma grande amiga que sempre irei admirar com muito carinho e respeito.

À Maria Jânia Teixeira e Cristina de Sousa Chaves, professoras e pesquisadoras de altíssima capacidade sempre dispostas a passar seus conhecimentos a todos. Agradeço a elas o conhecimento que tenho em imunologia e parasitologia.

À professora Zirlane Castelo Branco Coelho, por ter contribuído na execução desse trabalho e por todo o auxílio prestado, não somente nesse momento, mas durante os vários projetos que trabalhamos juntas em todos esses anos de convivência. Muitas manhãs e noites onde a alegria se misturava ao estresse da elaboração dos trabalhos, permitindo assim um ambiente muito mais agradável.

Aos meus filhotes, Juliana Montezuma Barbosa e Augusto César Aragão Oliveira, companheiros de luta, sempre presentes e dispostos a aprender e ensinar. Juntos, trabalhamos com amor e responsabilidade, o que tornou o ambiente de trabalho sempre agradável e divertido. Quantos almoços divididos, quantos choros consolados, quantas palavras de apoio, quantos segredinhos ocultados (para não falar fofocas), são todos incontáveis. Obrigada Gutinho e Bila!!! Vocês são maravilhosos!!!!

A todos os companheiros do Laboratório de Parasitologia: Dra. Kelma, Dr. Ivo, Dr. Anastácio, Dra. Daniele, Mestra Tatiana, Josias, Mário, Moura, Alísio, Dr. Wladimir, Lucineide, Camila, Lia Fernandes, Raíssa, Claudênia, Lindefânia.

A toda minha família (avó, tios, cunhados e primos), que sempre me deram muita força e apoio, sempre acreditando em meu potencial. Em especial à Rebeca Baia Sindeaux e Vera Neiva Martins Sindeaux, pelo companheirismo e amizade, por sempre se preocuparem comigo, e principalmente, por confiarem em mim.

À minha irmã, Angélica Sindeaux Frutuoso, pelo apoio na finalização desse trabalho, pelo companheirismo e principalmente por sempre me fazer acreditar que eu era capaz, quando eu não mais acreditava. Ao meu irmão, Daniel Sindeaux Frutuoso, por estar sempre disposto a ajudar, e mesmo com a distância era possível perceber a sua torcida pelas minhas conquistas.

Aos meus Padrinhos, Maria Zélia Soares Lins e Jurandir Frutuoso Silva, que sempre me acolheram e me ajudaram. Tios que se tornaram muito mais que isso, tornaram-se pais, que me incentivaram, acompanharam e sempre me trataram com amor, carinho e dedicação.

Aos meus avôs (*in memoriam*), Nilton Pereira Sindeaux e José Frutuoso da Silva, pelos exemplos de luta e coragem para enfrentar a batalha que é viver.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, que, através do programa PROAP, forneceu subsídios para compra de reagentes que possibilitaram a execução do presente trabalho, bem como o apoio financeiro concedido por meio da bolsa de auxílio.

RESUMO

MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA IN VITRO À *Leishmania chagasi* EM INDIVÍDUOS BAIXOS PRODUTORES DE IFN- γ

Introdução: Nas leishmanioses, proteção e cura se correlacionam com o desenvolvimento de resposta imune tipo Th1, e IFN- γ é considerada uma molécula chave nesta resposta. Ao contrário, a resposta Th2, resulta na progressão da doença. Vale ressaltar que a produção de IFN- γ , após o contato com a *Leishmania*, difere entre indivíduos saudáveis, alguns apresentam alta produção de IFN- γ (AP), enquanto outros respondem com baixa produção (BP). Isto tem sido observado com diversas espécies de *Leishmania*, assim como na infecção natural, na fase inicial da doença. A ativação do linfócito T pode ser modulada por coestimuladores, presentes na superfície de linfócitos e nas APCs, a exemplo da molécula sinalizadora na ativação de linfócitos T (SLAM). Evidências apontam para o envolvimento dessas moléculas na regulação da resposta imunológica. **Objetivo:** Avaliar o papel da via de sinalização de SLAM na modulação da resposta imune em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos BP, frente à estimulação in vitro por *Leishmania chagasi*. **Metodologia:** CMSP de indivíduos saudáveis BP foram estimuladas in vitro com *L. chagasi* na ausência ou na presença do anticorpo monoclonal anti-SLAM (α -SLAM), com ou sem tratamento por citocinas pró-inflamatórias (rIFN- γ ou rIL-12). Os sobrenadantes das culturas foram analisados por ELISA para IFN- γ e interleucina (IL)-10. **Resultados:** Sob estimulação de *L. chagasi*, o bloqueio da via SLAM não modificou a síntese de IFN- γ e IL-10, independente do tratamento com rIL-12. No entanto, o tratamento com rIFN- γ reduziu a síntese de IL-10 e elevou a secreção de IFN- γ endógeno, independente do bloqueio da via SLAM. **Conclusões:** O bloqueio da via SLAM, com adição de α -SLAM (10 μ g/mL), não interfere significativamente na produção de IFN- γ e IL-10. O tratamento das CMSP com rIFN- γ é capaz de induzir a redução da produção de IL-10 e o aumento de IFN- γ de forma significativa, enquanto que o tratamento com rIL-12 aumenta a produção de IFN- γ , mas não interfere na produção de IL-10 dos indivíduos baixos produtores. Faz-se necessário ampliar o estudo da ação imunomoduladora da SLAM frente à *Leishmania chagasi*, para um melhor entendimento do papel desta via de sinalização na resposta imunológica dos BP.

Palavras-chaves: *Leishmania chagasi*; Imunomodulação; SLAM; IFN- γ ; IL-10.

ABSTRACT

MODULATION OF IN VITRO IMMUNE RESPONSE TO LOW IFN- γ RESPONSES AGAINST LEISHMANIA CHAGASI

Introduction: Visceral leishmaniasis is a serious public health problem in several parts of the developing world. In leishmaniasis, protection and healing correlate with the development of Th1 immune response, and IFN- γ is considered a key molecule in this response. In contrast, the Th2 response results in disease progression. It is noteworthy that after contact with *Leishmania* the production of IFN- γ differs between healthy individuals. Some of them are high IFN- γ producer (HIFN- γ P), while others respond with low IFN- γ producer (LIFN- γ P). This has been observed in the in vitro response to several species of *Leishmania*, as well as in the early phase of the disease in patients with leishmaniasis. The activation of T lymphocytes can be modulated by immunomodulatory receptors present on the surface of lymphocytes and antigen presenting cells (APCs). Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150) is a transmembrane protein that promotes Th2 differentiation. Evidences support the involvement of this molecule in the immune response against parasites. **Objective:** To evaluate the role of SLAM signaling pathway in the modulation of immune response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from individuals low IFN- γ producers (LP) against *Leishmania chagasi*. **Methodology:** Healthy individuals' PBMC were stimulated in vitro with *L. chagasi* and monoclonal anti-SLAM (α -SLAM), in the presence or not of inflammatory cytokines (rIFN- γ or rIL-12). The supernatants of the cultures were analyzed by ELISA for the determination of IFN- γ and interleukin 10 (IL-10) concentrations. **Results:** Upon stimulation of PBMC with *L. chagasi*, the blocking of the SLAM signaling pathway with α -SLAM did not affect the synthesis of IFN- γ and IL-10, regardless of treatment with rIL-12. However, after rIFN- γ treatment of antigen stimulated cells it occurred a download of IL-10 synthesis and upload IFN- γ secretion, regardless of the blockade of SLAM signaling pathway. **Conclusions:** The blocking of SLAM signaling pathway with α -SLAM at the concentration of 10 μ g/mL does not interfere significantly in the IFN- γ and IL-10 production of PBMC from individuals LP stimulated with *Leishmania chagasi* promastigotes. Treatment of PBMC with rIFN- γ is able to induce a reduction of IL-10 and an increment of IFN- γ in the supernates cultures, whereas treatment with rIL-12 enhanced IFN- γ production, but does not interfered with IL-10. It is necessary to make further studies to better understand the role of the SLAM signaling pathway in the immune response of LP against *Leishmania chagasi*.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
I. INTRODUÇÃO	17
II. REFERENCIAL TEÓRICO	20
1. Leishmaniose Visceral: Aspectos gerais.....	21
2.1 Resposta imunológica inata.....	30
2.2 Resposta imunológica adquirida.....	31
3. A interação hospedeiro (homem)- <i>Leishmania</i>	36
3.1 A resposta imunológica à <i>Leishmania</i>	36
3.2 Estratégias da <i>Leishmania</i> para escapar da resposta imunológica.....	42
4. Moléculas moduladoras na ativação do linfócito T.....	46
4.1 Molécula sinalizadora na ativação linfocitária (SLAM).....	46
5. Interação SLAM-SAP-Tirosinafosfoquinase.....	52
6. Interação SLAM-SAP-TCR	54
III. JUSTIFICATIVA	56
IV. HIPÓTESE.....	58
1. Hipótese.....	59
V. OBJETIVOS.....	60
1. Geral	61
2. Específicos.....	61
VI. MATERIAL E MÉTODOS	62
VII. RESULTADOS	68
VIII. DISCUSSÃO.....	79
XI. CONCLUSÕES.....	86
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
XI. ANEXOS	112
ANEXO I.....	113
ANEXO II	114

LISTA DE FIGURAS

Figura-3 - Concentrações de IFN- γ utilizadas para separação dos indivíduos nos grupos alto ou baixo produtores.....	67
Figura-4 - Efeito de SLAM sobre a produção de IFN- γ induzida por <i>L. chagasi</i>	69
Figura-5 - Efeito de SLAM sobre a produção de IL 10 induzida por <i>L. chagasi</i>	70
Figura-6 - Correlação entre IFN- γ e IL 10 induzidos por <i>L. chagasi</i> sob bloqueio da via de SLAM.....	71
Figura-7 - Efeito de SLAM sobre a produção de IFN- γ induzida por <i>L. chagasi</i> , após tratamento com rIL-12.....	73
Figura-8 - Efeito de SLAM sobre a produção de IL-10 induzida por <i>L. chagasi</i> , após tratamento com rIL-12.....	74
Figura-9 - Efeito de SLAM sobre a produção de IFN- γ induzida por <i>L. chagasi</i> após tratamento com rIFN- γ	75
Figura-10 - Efeito de SLAM sobre a produção de IL-10 induzida por <i>L. chagasi</i> após tratamento com rIFN- γ	76

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura-1 – Distribuição da leishmaniose visceral no mundo.....19

Figura-2 – Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral segundo o município.....22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag - Antígeno

AP - Altos Produtores de IFN- γ

APC - Célula apresentadora de antígeno

Bcl-10 - *B Cell CLL/Lymphoma*

BCR - receptor de células B

BP - Baixos Produtores de IFN- γ

BTK - Tirosinaquinase de Bruton

C3b - Fragmento b da proteína C3 do sistema complemento

CMSP - Células Mononucleares do Sangue Periférico

CR1 - Receptor de complemento tipo 1

CTLA-4 - Antígeno 4 do linfócito T citotóxico

Dok 1 - *Docking protein 1*

Dok 2 - *Docking protein 2*

EAT - Ewing's sarcoma – *associated transcript*

EBV - Epstein-Barr virus

ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ERK - Quinase ativada por receptores extracelulares

GM-CSF - Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

gp63- Glicoproteína 63

ICOS - Coestimulantes induzíveis

ICOS-L - Ligantes dos coestimulantes induzíveis

IFN- γ - Interferon- γ

Ig-(X) - Imunoglobulina

IL-(X) - Interleucina

IMC - Imunidade Mediada por Células

ITAMs - Motivos ativadores baseados em tirosina dos receptores imunológicos

ITIMs - Motivos inibitórios baseados em tirosina dos receptores imunológicos

ITSMs - Motivos de troca baseados em tirosina dos receptores imunológicos

JAK - Janus quinase

LCL- Leishmaniose cutânea localizada

LPG- Lipofosfoglicano

LPS- Lipopolissacáride

LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana

LT- Leishmaniose Tegumentar

LV- Leishmaniose Visceral

LVA- Leishmaniose Visceral Americana

Mac - Complexo de ataque á membrana

MAP - Proteína ativada por mitógeno

MAPK - Proteína ativada por mitógeno quinase

MHC - Complexo de histocompatibilidade principal

NF- κ B - Fatores nucleares de transcrição κ B

NK - *Natural killer cell*

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PRR - Receptores de reconhecimento de padrões

PCR- Reação em cadeia de polimerase

PKC- θ Proteína quinase C-teta

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

rIFN- γ - Interferon- γ recombinante

rIL-12 - Interleucina 12 recombinante

SAP - Proteína associada à SLAM

SFM - Sistema Fagocítico Mononuclear

SH - Domínio Homólogo

SHIP - Proteína inositol fosfatase contendo domínio SH2

SHP - Proteína tirosina fosfatase contendo domínio SH2

SLAM - Molécula sinalizadora na ativação do linfócito

STAT - Transdutores de sinal e ativadores de transcrição

SYK - Tirosinaquinase esplênica

TCR - Receptor de células T

TGF- β - Fator de crescimento e transformação β

Th – T *helper*

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

Treg - Células T regulatórias

Trk - Proteínas quinases relacionadas à tropomiosina

ZAP70 - ζ -*chain-associated protein kinase* of 70 kDa

α -SLAM - anticorpo monoclonal anti-SLAM

I. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecto-parasitária, zoonótica, sendo o homem um hospedeiro susceptível que adquire a infecção ao entrar em áreas enzoóticas (ASHFORD, 1997). Constitui a forma mais grave das leishmanioses, conhecida no Oriente por “kala-azar” (febre negra), por apresentar febre irregular e escurecimento da pele.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a LV é endêmica em 62 países, e mais de 90% dos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (CHAPPUIS *et al.*, 2007). No Brasil, a maior incidência ocorre no Nordeste, com 92% do total de casos, seguido pela região Sudeste (4%), a região Norte (3%), e, finalmente, a região Centro-Oeste (1%), em algumas localidades, a taxa de letalidade chegou a 10% (BRASIL\MS, 2007).

Hospedeiros imunocompetentes desenvolvem, rapidamente, diversas estratégias para impedir a entrada da *Leishmania* nas células, sua multiplicação e disseminação, utilizando recursos da imunidade inata e da resposta adquirida (BRITTINGHAM *et al.*, 1999). Nas leishmanioses em geral, a resposta imune celular é considerada a mais importante, tanto na resistência, quanto na susceptibilidade. No modelo da LV, a resistência do hospedeiro envolve a participação de células T CD4+, T CD8+, além da produção de citocinas como IL-2, IFN- γ e IL-12; enquanto que a susceptibilidade está relacionada à síntese de IL-10, mas não de IL-4 (BACELLAR *et al.*, 2000; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Vale ressaltar que a produção de IFN- γ , após o contato com a *Leishmania*, difere entre indivíduos sadios, alguns produzem grandes quantidades de IFN- γ , enquanto outros o produzem em baixas concentrações (POMPEU *et al.*, 2001). Este achado tem sido observado com diversas espécies de *Leishmania*, *in vitro*, assim como em indivíduos naturalmente infectados, na fase inicial da doença (ROCHA *et al.*, 1999; BOURREAU *et al.*, 2001).

A ativação das células do sistema imunológico é modulada através do equilíbrio dos sinais acionados por uma diversidade de receptores ativadores, receptores coestimuladores e receptores inibidores. A molécula sinalizadora na ativação do linfócito (SLAM) pertence à família de receptores relacionados à SLAM, que é um subgrupo da superfamília das imunoglobulinas. SLAM é um receptor de superfície celular que atua

modulando a função de diversas células hematopoiéticas envolvidas na imunidade inata e adquirida (VEILLETTE; LATOUR, 2007).

A ação moduladora de SLAM está associada à sua capacidade de interagir com um adaptador intracitoplasmático, a proteína associada à SLAM (SAP). A interação entre SLAM e SAP influencia de forma marcante a resposta imunológica (GARCIA; CHULUYAN, 2007).

A expressão de SLAM e SAP tem demonstrado exercer controle na produção de IFN- γ pelo linfócito T, citocina essencial na defesa do hospedeiro contra infecções por agentes intracelulares. A modulação da resposta imunológica por essas moléculas tem sido estudada nas infecções por *Mycobacterium leprae* (GARCIA *et al.*, 2001), *M.tuberculosis* (PASQUINELLI *et al.*, 2004), vírus da coriomeningite linfocítica (WU *et al.*, 2001), *Toxoplasma gondii* (CZAR *et al.*, 2001), *L.major* (WANG *et al.*, 2004) e *L. amazonensis* (VILAR, 2009). No entanto, esta modulação ainda não foi investigada na infecção por *L. chagasi*.

Assim, torna-se fundamental a compreensão dos mecanismos imunológicos que controlam a resposta do hospedeiro ao parasito e que direcionam esta ação para um padrão de citocinas Th1, importante para a eliminação de patógenos intracelulares

O presente estudo tem como objetivo avaliar se a resposta imunológica de indivíduos baixos produtores de IFN- γ é modulada pela via de sinalização SLAM-SAP, na estimulação *in vitro* por *L. chagasi*.

II. REFERENCIAL TEÓRICO

1. Leishmaniose Visceral: Aspectos gerais

1.1 Epidemiologia

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária, zoonótica (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987), considerada um grande problema de saúde pública, que representa um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (BRASIL/MS, 2007). A estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) é de que a prevalência mundial seja de aproximadamente 12 milhões de casos e o número de pessoas expostas ao risco de contrair a doença possa ser 350 milhões, com registro de 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar (LT) e 500.000 de leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2009).

Entre as formas clínicas das leishmanioses, a leishmaniose visceral (LV) ou calazar constitui-se na mais grave, pois, quando não tratada adequadamente, determina elevados índices de letalidade (WHO, 2009). A LV encontra-se amplamente distribuída no mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África e Américas (WHO, 1990; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; FUNASA, 1996)(Figura-1).



Figura 1 - Distribuição mundial da leishmaniose visceral.
Fonte: CHAPPUIS *et al.*, 2007.

Segundo a OMS, a LV é endêmica em 62 países, com registro anual de 50.000 mortes (WHO, 1990; DESJEUX, 1996 e 2004). Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

No continente americano é conhecida como leishmaniose visceral americana (LVA), tendo maior prevalência em crianças na faixa etária de zero a nove anos, correspondendo a 80% dos casos detectados, ocorrendo com frequência em regiões nas quais a pobreza e desnutrição são comuns (BADARÓ; JONES; LOURENÇO, 1986; WHO, 1990; FUNASA, 1996). A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular, agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio. Por outro lado, o envolvimento do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da LV, pelas formas frustras (oligossintomáticas) ou assintomáticas, além das formas com expressão clínica (BRASIL\MS, 2005).

Nos últimos 10 anos, foi notificado no Brasil uma média de 30 mil casos de LT e de 3.000 de LV por ano (MS-SVS, 2003). Além disso, a doença tem sido relatada em 19 dos 26 estados do país, em mais de 1.600 municípios. A região com a maior incidência foi o Nordeste, que apresentou 92% do total de casos, seguido pela região Sudeste (4%), Norte (3%) e Centro-Oeste (1%) (MS-SVS, 2006).

O município de Fortaleza apresentava, até 1999, baixas prevalências de LV, tanto da infecção canina como da humana. No entanto, a partir desse ano, ocorreu um aumento importante e persistente na prevalência da doença humana, com confirmação de 3.147 casos novos no período de 2001 a 2007, atingindo o pico em 2006: época em que foram registrados 239 casos da doença (BRASIL/SESA, 2008).

Historicamente, a LV no Brasil teve seu início associada ao ambiente rural, baseada especialmente em estudos realizados em Sobral (CE) no período de 1954 a 1956 quando uma séria epidemia ocasionou dezenas de mortes. Neste momento, cães e vetores foram associados à cadeia epidemiológica do ciclo doméstico. O flebotomíneo *Lutzomyia*

longipalpis foi identificado como vetor, através de estudos de competência vetorial (DEANE; DEANE, 1954a, 1954b; DEANE, 1956).

Drásticas alterações no meio ambiente, causadas pela ação humana, mudaram a ecologia de algumas espécies de vetores e de *Leishmania* e, deste modo, a epidemiologia das leishmanioses (RANGEL, 1995). Segundo dados do IBGE, 85% da população do país vive em área urbana, o que cria condições favoráveis para a emergência e reemergência de doenças, entre elas a LV. Associado a isto há ainda um complexo de fatores, como mudanças ambientais e climáticas, redução dos investimentos em saúde e educação, descontinuidade das ações de controle, adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem, fatores pouco estudados ligados aos vetores (variantes genéticas), e novos fatores imunossupressivos, tais como a infecção pelo HIV e dificuldades de controle da doença em grandes aglomerados urbanos, nos quais problemas de desnutrição, moradia e saneamento básico estão presentes (GONTIJO; MELO, 2004). Todos esses fatores contribuíram para que o homem passasse a viver em freqüente associação com a cadeia epidemiológica, de modo que um novo perfil de transmissão pudesse ser considerado, no qual os seres humanos já não seriam considerados hospedeiros acidentais desta doença (RANGEL, 1995; GONTIJO; MELO, 2004). Encontrando um ambiente com clima adequado à proliferação do vetor, a presença abundante de cães como hospedeiros e uma população humana susceptível à doença pode sofrer expansão rapidamente (MOTT *et al.*, 1991; JERÔNIMO *et al.*, 1994).

Os três principais fatores que contribuem para o aumento da incidência da LV são: migração, ausência de medidas de controle e co-infecções com HIV (BOELAERT *et al.*, 2000; DESJEUX, 2001).

A LV está, há alguns anos, em expansão e urbanização, ocorrendo elevados números de casos humanos e de cães infectados em várias cidades de grande e médio porte (BRASILMS, 2005). A ocorrência da doença tem caráter cíclico, com surtos cada vez mais expressivos. Em meados dos anos 80, constatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica da LV, quando se começou a observar a ocorrência de surtos epidêmicos em Teresina (PI) e, a partir de então, foram diagnosticados casos autóctones em São Luís (MA), Fortaleza (CE), Natal (RN), Aracaju (SE), Belo Horizonte (MG), Santarém

(PA), Corumbá (MS), Campo Grande (MS), Palmas (TO), Araçatuba (SP). Foi então que, nessa mesma década, a doença, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos (GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL\MS, 2005). O coeficiente de incidência da doença tem alcançado 20,4 casos/100.000 habitantes, em algumas localidades de estados nordestinos, como Piauí, Maranhão e Bahia (BRASIL\MS, 2005). As áreas de transmissão da doença no Brasil estão representadas na figura 2.

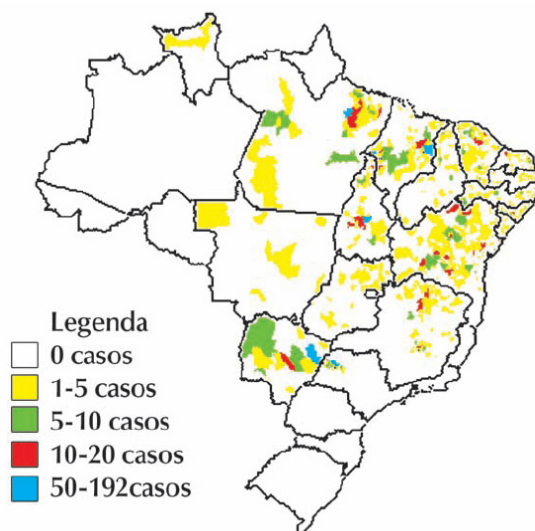


Figura 2 - Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose visceral segundo o município.

Entretanto, pouco se conhece sobre a epidemiologia da LV nos focos urbanos. Além disso, as relações entre os componentes da cadeia de transmissão no cenário urbano parecem ser bem mais complexas e variadas do que no rural (GONTIJO; MELO, 2004).

A ocorrência de infecções subclínicas nas áreas urbanas, decorrentes da permanente exposição do homem às picadas infectantes, prenuncia um grave problema associado à circulação do vírus HIV, podendo levar a LV a adquirir caráter de parasitose oportunista (DEDET; PRATLONG, 2000). De fato, o comportamento da LV difere na co-infecção com HIV, refletindo-se principalmente na resposta irregular ao tratamento e alteração do padrão diagnóstico nos pacientes com esse tipo de infecção (GONTIJO; MELO, 2004.)

O processo de expansão geográfica e urbanização da LV conduzem à necessidade de se estabelecer medidas mais eficazes de controle. Em grande parte dos estudos realizados sobre epidemias urbanas, tem sido relatado o encontro de cães infectados (SILVA *et al.*, 2001; CABRERA *et al.*, 2003). Em algumas áreas foi possível observar que os casos caninos precederam o aparecimento da doença humana (CAMARGO-NEVES *et al.*, 2001). Entretanto, não há concordância entre os pesquisadores de que a LV canina seja fator de risco necessário para a LV humana, embora a maioria dos estudos até agora realizados apontem nessa direção. Esta é uma questão que necessita de maiores estudos para ser inteiramente esclarecida (GONTIJO; MELO, 2004).

1.2 Agente etiológico

A leishmaniose é uma parasitose causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Segundo a classificação atual proposta pela Sociedade Internacional de Protistologistas (ADL *et al.*, 2005), baseada na ultra-estrutura genética e molecular, os agentes etiológicos das leishmânias estão inseridos no Supergrupo Excavata e táxons Euglenozoa, Kinetoplastea, Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania*. Neste gênero existem mais de 20 espécies distribuídas em regiões de clima tropical e subtropical de todo o Mundo, com exceção da Oceania.

As classificações mais utilizadas para as leishmânias, na atualidade, seguem o modelo taxonômico proposto por Lainson e cols., que dividem as leishmânias nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987). As espécies do subgênero *Viannia* apresentam desenvolvimento no intestino posterior do flebotomíneo, aderidos à parede, na região do piloro, enquanto aquelas do subgênero *Leishmania* mostram o desenvolvimento parasitário no intestino médio e anterior dos flebotomíneos (MARZOCHI, 1992; PEREIRA-NEVES *et al.*, 2005; VALE & FURTADO, 2005).

As espécies capazes de visceralizar e causar a LV são agrupadas no Complexo Donovan, formado por: *L. donovani*, na Índia, Bangladesh, Paquistão e Nepal; *L. infantum*, na região Mediterrânea (Europa e África) e *L. chagasi* em diferentes países da América (Novo Mundo), incluindo o Brasil (LAISON, 1983; WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005).

Existe uma grande divergência quanto à origem da LV no Novo Mundo – se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela espécie *L. infantum*, ou se sua chegada se deu há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, sendo a espécie classificada como *L. chagasi*. Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone do parasito (LAINSON.; RYAN; SHAW, 1987; MAURICIO *et al.*, 1999; MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000). Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (MAURICIO, 2000; WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005).

1.3 Ciclo evolutivo

A leishmaniose é transmitida por flebotomíneos fêmeas (Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-família Phlebotominae) que se infectaram durante o repasto sanguíneo a partir de reservatórios infectados pelo parasito, no intuito de obter proteínas necessárias ao desenvolvimento de seus ovos. Existem cerca de 500 espécies conhecidas de flebotomíneos, no entanto, destas, apenas 30 têm sido identificadas como vetores da doença (WHO, 2009). Ao ingerir sangue infectado o inseto fêmea adquire também as formas amastigotas que, dentro da membrana peritrófica, transformam-se em formas promastigotas, flageladas, e multiplicam-se ativamente no intestino do inseto vetor. Neste, elas passam pela metaciclogênese, deixando de reproduzir-se e tornando-se promastigotas metacíclicas infectantes. Esse processo ocorre após as promastigotas terem sofrido modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo, assim, sua capacidade de adesão ao

epitélio do intestino médio do flebotomíneo. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se, migrando para a faringe e cavidade bucal. Quando o vetor infectado alimenta-se do sangue de um humano ou de outro mamífero, injeta as formas infectantes promastigotas metacíclicas e estas são fagocitadas pelas células do SFM (como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas imaturas) do hospedeiro vertebrado, onde se transformam em amastigotas (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; LIESEA; CHLEICHERA, 2008). As amastigotas reproduzem-se por fissão binária e a multiplicação dos parasitos no interior das células infectadas pode progredir até o rompimento da mesma, liberando as amastigotas que poderão infectar outras células fagocíticas, dando continuidade ao ciclo (BAÑULS, 2007).

1.4 Transmissão da leishmaniose visceral

No Brasil, os vetores responsáveis pela transmissão da *L. (L.) chagasi* ao homem são as espécies *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* que foi incriminada como vetor em foco no estado do Mato Grosso do Sul, sendo que a *Lu. longipalpis* é a principal espécie transmissora da LV nas Américas, pois encontra os critérios mais importantes estabelecidos para a competência vetorial, como antropofilia, distribuição espacial coincidente com casos humanos da doença e infecção natural por *L. chagasi* (DEANE, 1956; BADARÓ; JONES; LOURENÇO, 1986; EVANS *et al.*, 1992; LAINSON; SHAW, 1998; LAINSON; RANGEL, 2005).

No ambiente silvestre, os reservatórios até agora conhecidos são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, as raposas foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica. Os marsupiais didelfídeos foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (BRASIL/MS, 2005). O fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre os ciclos silvestre e doméstico (GONTIJO; MELO, 2004).

Segundo a OMS, excetuando-se os casos de LV por *L. donovani* na Índia, onde o reservatório é o próprio homem, a principal fonte de infecção para *L. chagasi* é o cão (*Canis familiaris*), sendo um dos alvos das estratégias de controle (WHO, 1990; BOELAERT *et al.*, 2000). Provavelmente isso é devido ao maior ataque do vetor aos animais que à pessoas, ou ainda, pelo fato de que estes animais, que compartilham o ambiente doméstico, apresentarem maior parasitemia que os humanos, podendo ser observado células infectadas em amostras de pele e sangue, o que facilita a infecção dos vetores (LAINSON 1983; SHERLOCK, 1996; IKEDA-GARCIA *et al.*, 2007). Entretanto, para se determinar o papel destes animais na manutenção da transmissão da LV, são necessários maiores estudos.

Existem dois tipos de LV com base na diferença da transmissão: a LV zoonótica, a qual é transmitida pelo vetor ao realizar seu repasto sanguíneo em um animal infectado e, em seguida, transmite o protozoário para o homem; e a LV antroponótica, cuja infecção ocorre quando, através do inseto vetor, o protozoário é transmitido de um homem infectado para outro homem. No entanto, a LV antroponótica é encontrada apenas em áreas de transmissão de *L. donovani*, não ocorrendo no Brasil, enquanto que LV zoonótica é encontrada nas áreas de transmissão de *L. chagasi* (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

1.5 Manifestações clínicas

O período de incubação da LV é bastante variável. No homem, pode levar entre 10 dias e 24 meses, com média entre 2 a 6 meses (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Após esse período, um amplo espectro de resposta individual à infecção por *L. chagasi* pode ser observado, na dependência de fatores relacionados à natureza da resposta imune do hospedeiro, à virulência do parasito, à idade e ao estado nutricional do indivíduo (BADARÓ; JONES; LOURENÇO, 1986). O espectro clínico varia de infecção inaparente

à LV grave, que pode ser fatal, mesmo na vigência da terapêutica no início das manifestações clínicas (CAVALCANTE, 2007).

Muitos dos indivíduos infectados pelo parasito não manifestam a doença ou desenvolvem sintomas moderados ou transitórios como diarreia, tosse seca, adinamia, febrícula, sudorese e discreta hepatoesplenomegalia (ALVES, 1996; BADARÓ; JONES; LOURENÇO, 1986; GAMA *et al.*, 2004), que podem evoluir ou não para a forma clássica da doença. Esta, por sua vez, consiste de febre, hepatoesplenomegalia, com esplenomegalia volumosa, perda de peso, tosse, diarreia, dor e distensão abdominal, além de icterícia e envolvimento renal, que também têm sido descritos (BADARÓ; JONES; LOURENÇO, 1986). Alguns pacientes, porém, desenvolvem uma forma grave da enfermidade constituída por febre prolongada, hepatoesplenomegalia e um quadro de disfunção da medula óssea manifestada por anemia e leucopenia (BADARÓ; JONES; LOURENÇO, 1986; SILVA *et al.*, 2001; CAVALCANTE, 2007).

Infecções, hemorragias e anemia grave são responsáveis pela maioria das mortes, e o retardo no diagnóstico, a baixa idade e a desnutrição são implicados como importantes fatores que contribuem para o óbito (ALVES, 1996; BRASIL/FUNASA, 1999).

2. O sistema imunológico na infecção por patógenos intracelulares

O hospedeiro defende-se da agressão dos patógenos desenvolvendo diversas estratégias mediadas principalmente pelo sistema imunológico. A resposta imunológica consiste de uma série de eventos inespecíficos, da imunidade inata e, específicos, da imunidade adquirida, sendo orquestrada para que haja um perfeito equilíbrio entre os sinais ativadores e inibitórios que percorrem os receptores e co-receptores (YAMAMURA *et al.*, 1991). A resposta desenvolvida pelo hospedeiro deve ser competente no sentido de prevenir a invasão, proliferação e disseminação, e se possível, eliminar o agente agressor, no

entanto, deve ser equilibrada a fim de preservar o hospedeiro, evitando provocar excessivos danos teciduais por uma resposta exacerbada ou prolongada, sendo importante a obtenção de uma resposta que preserve a homeostasia do sistema imunológico (BACHMANN; KOPF, 2002; OBST *et al.*, 2005).

2.1 Resposta imunológica inata

A resposta imunológica inata caracteriza-se por ser inespecífica e mais rápida e não gerar memória imunológica, podendo, entretanto, ser crucial para limitar a replicação e a propagação de agentes infecciosos, nos momentos iniciais da infecção. A magnitude e a qualidade da resposta adquirida são dependentes de sinais derivados dessa resposta (BACHMANN; KOPF, 2002; LE BON; TOUGH, 2002).

Para que haja uma resposta efetiva contra agentes microbianos é necessário que haja interação entre a resposta inata e a adaptativa, e a participação de uma variedade de receptores de superfície, citocinas e quimiocinas na indução de uma imunidade protetora. Uma vez ultrapassada a barreira físico-química pelo patógeno, a resposta imunológica inata utiliza outros recursos, como os polimorfonucleares, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK), linfócitos NKT, ativação dos receptores *toll-like* e frações do complemento, dentre outros (PASARE; MEDZHITOV, 2005).

Ao penetrar no tecido do hospedeiro, o patógeno é detectado através dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) presentes na superfície da membrana de várias células, que compõem a resposta imunológica inata. A interação patógeno-receptor PRR induz à expressão de moléculas de adesão e coestimuladoras, e liberação de citocinas e quimiocinas como interleucina (IL)-1, IL-8, IL-12 e IFN- γ . Conseqüentemente, ocorre a migração das células de defesa para o sítio lesado (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; SCHRODER; SWEET;

HUME, 2006). Nos momentos iniciais da infecção, os macrófagos secretam uma variedade de citocinas e quimiocinas que atraem células NK e outras células inflamatórias para o sítio da infecção. Este recrutamento precoce de células NK é crítico para que elas possam secretar uma grande quantidade de IFN- γ no local, levando à ativação de macrófagos (MOSSER, 2003; SCHRODER; SWEET; HUME, 2006). O IFN- γ , por sua vez, estimula a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II nas células e ativa as funções microbicidas dos macrófagos. Então, as células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, células de Kupffer capturam, internalizam e processam o patógeno, selecionando o antígeno (peptídeo – epítipo) a ser apresentado unido à molécula do MHC de classe II para que seja reconhecido pelo linfócito T auxiliar (Th) (ABBAS; MURPHY, 1996). As APCs, como macrófagos e células dendríticas, secretam IL-12, citocina que atua nos linfócitos T e nas células NK, estimulando a produção de IFN- γ e promovendo a diferenciação de linfócitos T. A IL-12 desempenha um papel decisivo no direcionamento da resposta Th1, a qual é indispensável à eliminação de patógenos intracelulares. Assim, a apresentação de antígenos pelas APCs aos linfócitos T constitui a interface entre a resposta imunológica inata e a resposta imunológica adquirida (YOSHIDA *et al.*, 2001; NACY *et al.*, 1991; BOEHM *et al.*, 1997).

2.2 Resposta imunológica adquirida

A imunidade adquirida é caracterizada por uma ampla especificidade para distinguir as diferentes moléculas e por uma habilidade de memória, podendo levar a uma resposta mais intensa à exposições subsequentes a um mesmo patógeno (ABBAS; MURPHY, 1996). Devido o mecanismo de geração de receptores envolver grande variabilidade e recombinação de segmentos de genes de receptores, o sistema imunológico

adaptativo pode proporcionar um reconhecimento específico de antígenos estranhos e memória imunológica (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

A imunidade adaptativa reconhece estruturas moleculares específicas e depende da geração de um grande número de receptores de antígenos, ou seja, receptores de células T (TCR) e receptores de células B (BCR), por processos de rearranjos somáticos. Uma vez que as células T reconhecem antígenos estranhos às elas apresentados, dão início as respostas imunes adaptativas contra estes antígenos. Estas respostas incluem ataque direto das células apresentadoras de antígeno por linfócitos T citotóxicos, a estimulação de células B para produção de anticorpos contra os antígenos, e indução de inflamação, com o progresso das respostas inatas, na área onde o antígeno está presente. Todas estas respostas colaboram para que as defesas do hospedeiro eliminem as partículas ou microorganismos estranhos. Quando expressas inadequadamente, podem dar origem a doenças auto-imunes ou rejeição a transplantes (CHEN *et al.*, 2007). A ativação das respostas adaptativas fornece ferramentas sofisticadas de especificidade e de memória para impedir reinfecções. Ambos os sistemas, inato e adquirido, são necessários para que o hospedeiro monte e mantenha defesas eficazes contra agentes patogênicos (PASARE; MEDZHITOV, 2005).

As células do sistema imune comunicam-se para iniciar, estabelecer e manter uma resposta imune. Essa comunicação é realizada através do contato célula-célula ou através de uma variedade de mediadores incluindo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e hormônios. A transmissão de sinais a partir do meio extracelular é feita pelos receptores de superfície; alguns deles possuem componentes intrínsecos com atividade enzimática nos domínios citoplasmáticos, porém, a via de transdução do sinal mais comum envolve interações entre receptores de membrana e proteínas transmembranares ou proteínas adaptadoras citoplasmáticas (KOTENKO; PESTKA, 2000; LANIER, 2001). No caso das citocinas, o sinal é transmitido através de receptores de superfície específicos para cada citocina. Neste ponto, o sinal é também decodificado e amplificado. A ligação do ligante ao seu receptor acarreta o recrutamento e/ou a ativação de proteínas citoplasmáticas. Assim, torna-se possível a ativação de vias de transdução do sinal que levam à regulação de um amplo espectro de atividades biológicas (KOTENKO; PESTKA, 2000). A função dos leucócitos é regulada pela integração dos sinais positivos e negativos recebidos através dos

receptores da superfície celular. Alguns deles podem transmitir sinais inibitórios ou ativadores, que podem ser importantes para a regulação das respostas imunes, as quais precisam de um início e de um término. Em muitos casos, isso é feito pelas atividades enzimáticas de cinases e fosfatases envolvidas (LANIER, 2001).

Entre os receptores imunológicos tem-se o TCR, BCR, receptores de imunoglobulinas, macrófagos, monócitos, células mielóides, entre outros, que se associam aos seus ligantes. A interação receptor-ligante resulta em um sinal de fosforilação em cascata, fundamental para a ativação das células do sistema imunológico (LATOURE *et al.*, 2001; VEILLETTE, 2006).

A resposta imunológica adquirida é dirigida pela ativação do linfócito T auxiliar com a rápida expansão dos linfócitos antígeno-específicos e a produção de células de memória de longa duração contra o antígeno envolvido. Nesse processo, o TCR deve reconhecer o antígeno no contexto do MHC de classe I ou de classe II na superfície das APCs. Para que ocorra de maneira efetiva, a resposta imunológica adquirida necessita de dois sinais. Um dos sinais é deflagrado através do TCR desencadeado pelo reconhecimento do antígeno acoplado ao MHC. Esse sinal é antígeno específico e induz o início do ciclo celular (GABRIEL; LATTIME, 2007). O outro sinal corresponde à coestimulação, que modula o sinal proveniente dos receptores imunológicos, sendo mediada pela ligação entre moléculas coestimuladoras ou co-receptoras aos seus ligantes na superfície das APCs. Como exemplo tem-se o CD28 que interage com B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) expressos na superfície das APCs, e os coestimulantes induzíveis (ICOS), que se associam aos seus ligantes (ICOS-L), expressos nas APCs (VEILLETTE, 2006).

Para elaborar uma resposta imunológica eficaz, os linfócitos T respondem a uma variedade de sinais gerados por moléculas co-receptoras, em adição àqueles gerados pelo TCR. A integração desses sinais irá resultar numa cascata de sinalização intracelular, culminando com diferenciação da célula T efetora. Moléculas co-receptoras fornecem às células a capacidade de discriminar o contexto em que o antígeno é apresentado, regulando as interações entre as células T e as APCs e o limiar de ativação de células T. Além disso, sinais gerados por essas moléculas modulam outros aspectos das respostas mediadas pela célula T como a anergia ou a apoptose (SAIBIL; DEENICK; OHASHI, 2007). A

participação de moléculas co-receptoras é crucial na elaboração de uma resposta imunológica efetiva, visto que o sinal através do TCR não é suficiente para gerar uma ativação plena do linfócito T (MULLER *et al.*, 1987; BRETSCHER; COHN, 1970; CHAMBERS, 2001). Moléculas correceptoras CD4, CD8, e coestimuladoras como CD2, CD28, CD40, CD150 (SLAM), entre outras, são necessárias para a ativação do linfócito T (CHAMBERS, 1999; CHAMBERS, 2001; ENGEL, 2003; VEILLETTE, 2006a), enquanto o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4), um importante regulador da homeostasia das células T periféricas, apresenta atividade inibitória nessa célula (CHAMBERS, 1999; CHAMBERS, 2001). Conseqüentemente a essa ativação ocorre proliferação, diferenciação e memória celular (JUDD, 2000). Além disso, evita a anergia e a apoptose que aconteceriam se o sinal fosse mediado apenas pelo TCR (MULLER, 1987; CHAMBERS, 2001).

A propagação do sinal intracelular é mediada por uma cascata de fosforilação de motivos baseados em tirosina, que podem ser ativadores (ITAMs – motivos ativadores baseados em tirosina dos receptores imunológicos) ou inibitórios (ITIMs – motivos inibitórios baseados em tirosina dos receptores imunológicos). Os ITAMs apresentam a seguinte seqüência consenso de aminoácidos YxxL/IxYxxL/I, enquanto os ITIMs a seqüência I/V/LSxYxxL/V, onde Y corresponde à tirosina, L à leucina, I à isoleucina, V à valina, S à serina e x a resíduo de qualquer aminoácido. Os ITIMs presentes nos receptores inibitórios e previamente fosforilados por proteínas quinases, preferencialmente interagem com proteína-tirosina-fosfatases, como SHP-1/2, ou lipídio-fosfatases, como SHIP-1/2 (VEILLETTE, 2002).

A cascata de fosforilação na ativação do linfócito T inicia na porção citoplasmática dos receptores e co-receptores, onde estão situados os ITAMs. Como essas moléculas não apresentam atividade proteína tirosina quinase próprias, interagem com proteínas quinases através dos seus motivos baseados em tirosina, sendo então fosforiladas. As proteínas quinases envolvidas nessa cascata pertencem às famílias Src, BTK (Tirosina quinase de Bruton) e ZAP70 (ζ -chain-associated protein kinase of 70 kDa – proteína quinase de 70 kDa associada à cadeia ζ) / SYK (tirosina quinase espênica) (VEILLETTE ; CRUZ-MUNOZ; ZHONG, 2006). Essa cascata de fosforilação promove movimentação do

cálcio, reorganização do citoesqueleto, ativação de proteínas MAPK, ativação de fatores de transcrição citoplasmáticos, produção de citocinas e ativação das propriedades citotóxicas (ROUX; BLENIS, 2004).

Atuando em conjunto, TCR e coestimulação induzem sinais de transdução intracelular, fosforilação de proteínas quinases, ativação de fatores de transcrição citoplasmáticos, como NF- κ B, que migram para o núcleo. Então, os fatores de transcrição atuam nos genes específicos da IL-2 e do seu receptor, resultando em produção de IL-2. Essa citocina tem propriedade autócrina, promovendo a expansão de linfócito T efetores. A divisão celular ocorre após a ligação de IL-2 ao seu receptor IL-2R (SAMELSON, 2002).

Essas interações induzem à proliferação de linfócitos T e produção de citocinas específicas, assim as células T CD4⁺ *naive* se diferenciam em subpopulações Th1, Th2 e Th17 e induzem suas funções efetoras (MOSMANN; SUD, 1996; BETTELLI *et al.*, 2008). Th1 secreta grande quantidade de IFN- γ e linfotóxina, ~~quã~~ responsáveis pela eliminação de patógenos intracelulares, através da ativação de macrófagos (MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 1983). Já as células Th2 secretam predominantemente IL-4, IL-5, IL-13, IL-25 e medeiam a imunidade contra patógenos extracelulares (ANSEL *et al.*, 2006). Além disto, produção de IL-4 e IL-5 pode ativar mastócitos e eosinófilos, induzindo a atopia e reações alérgicas. Células Th17 surgiram como a terceira subpopulação de células T que parecem desempenhar um papel importante, principalmente, na proteção contra certos patógenos extracelulares. Além disso, foi demonstrado que células Th17 que, porventura, reconheçam antígenos próprios, tornam-se altamente patogênicas por desencadear inflamação e autoimunidade grave. A diferenciação inicial das células T no subtipo Th17 encontra-se associada à determinadas características da ativação, tais como: expressão combinada de TGF- β e IL-6 e dos fatores de transcrição STAT3 e ROR . Células Th17 são capazes de induzir sua própria multiplicação e diferenciação através da produção de IL-21. Desta forma, as células Th17 perfazem três etapas distintas de desenvolvimento: diferenciação, amplificação e estabilização, todas coordenadas pelo padrão de citocinas presente (BETTELLI; OUKKA; KUCHROO, 2007).

As citocinas de uma subpopulação são capazes de inibir o desenvolvimento de outra subpopulação. Outro papel importante da imunorregulação é desempenhado por outra

subpopulação de linfócitos T, com funções regulatórias, denominado de células T regulatórias (Treg), que compreende os linfócitos supressores, com funções de bloqueio ou modulação negativa da resposta Th, a fim de manter essa reação dentro de um limite adequado (SUVAS *et al.*, 2003), evitando o desenvolvimento de autoimunidade ou neoplasias de linhagem linfóide (VELDMAN *et al.*, 2006).

As células Treg CD4⁺ diferenciam-se em dois subtipos de acordo com seus mecanismos efetores e especificidade. Um subtipo corresponde às células CD4⁺CD25⁺ naturais, cuja ação supressora requer contato celular através de receptores de membrana e supõe-se que o fator de crescimento transformador (TGF-β) seja responsável pelo efeito inibitório dessas células. O outro subtipo de células Treg é adaptativo e surge como consequência da ativação de linfócitos T, exercendo sua atividade através de citocinas supressoras solúveis, tais como IL-10 e TGF-β. Essas células são provenientes de células CD4⁺CD25⁻ e dividem-se em Tr1, capazes de produzir altas concentrações de IL-10 e reduzida quantidade de TGF-β, e Th3, com habilidade de produzir principalmente TGF-β (LEVINGS *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003; SAKAGUCHI, 2004).

3. A interação hospedeiro (homem)-*Leishmania*

3.1 A resposta imunológica à *Leishmania*

O hospedeiro, com competência imunológica e sem infecção prévia por *Leishmania*, ao ser infectado por esse parasito é capaz de desenvolver, em poucos dias, uma resposta imune com uma diversidade de eventos, que podem evitar a entrada do parasito nas suas células, sua proliferação e disseminação, promovendo a eliminação do patógeno e o controle da infecção (VON STEBUT *et al.*, 1998; LASKAY *et al.*, 1995).

Os eventos iniciais da interação *Leishmania*-hospedeiro são fundamentais na evolução da infecção, sendo determinantes para o desenvolvimento do controle da infecção

ou da progressão da doença, com seus diversos padrões clínico-imunológicos (SCOTT, 1991; VON STEBUT *et al.*, 1998; JI; SUN; SOONG, 2003), que dependem da resposta imune mediada por células (BARRAL-NETTO *et al.*, 1997). Tem sido sugerido que a evolução da infecção para a doença depende de um desequilíbrio transitório da função do linfócito T, nos eventos iniciais da infecção (ROCHA *et al.*, 1999; HIMMELRICH *et al.*, 2000).

A resistência à infecção por *Leishmania* está associada com o desenvolvimento predominante de uma ativação de linfócitos T, que resulte em uma resposta imunológica Th1, com uma adequada produção de IFN- γ , induzida por IL-12. Enquanto a susceptibilidade está relacionada à uma resposta imunológica com perfil Th2, revelando produção de IL-4 e IL-13 no estágio inicial da resposta do hospedeiro, reduzida participação de IL-12 e baixa produção de IFN- γ , com conseqüente prejuízo na ativação de macrófagos (POMPEU *et al.*, 2001; BELKAID *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 2002). A LV é marcada pelo comprometimento da resposta imune celular Th1, tendo como conseqüência a deficiência ou mesmo ausência de citocinas como IFN- γ e IL-12, além do aumento de IL-10 e IL-4 (CARVALHO *et al.*, 1985; CARVALHO *et al.*, 1994; GHALIB *et al.*, 1995). Tem sido mostrado que a produção de IL-4 e TGF- β está relacionada a progressão da leishmaniose em camundongos. Na LV murina, camundongos BALB/C infectados com *L. chagasi* mostraram que TGF- β induzia a inibição da produção de IFN- γ por células T CD4⁺ (WILSON *et al.*, 1998).

A IL-12, proveniente principalmente de macrófagos e células dendríticas (HOWIE *et al.*, 2002b), desempenha um papel central na ativação do linfócito T e conseqüente produção de IFN- γ . Diferentes tipos celulares produzem IFN- γ sob estimulação de IL-12 e IL-18, dentre eles células NK, linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas (AIROLDI *et al.*, 2000).

O IFN- γ desempenha um papel importante na determinação dos eventos celulares iniciais na infecção por *Leishmania*, e pode participar do controle da ativação de macrófagos através do óxido nítrico (GREEN *et al.*, 1994; BOEHM *et al.*, 1997; BOGDAN; ROLLINGHOOF, 1998; SHTRICHMAN; SAMUEL, 2001). Conseqüentemente, uma resposta tecidual menos lesiva será observada pelo recrutamento

precoce de células mononucleares, ao invés de polimorfonucleares (PEARL *et al.*, 2001). Além disso, o IFN- γ induz citocinas que promovem a diferenciação de linfócitos virgens em linfócitos Th1, secretores de IFN- γ , no curso da resposta imunológica específica (MOSMANN; SUD, 1996), estimula a expressão de moléculas do MHC classe I e II e de seus co-estimuladores na superfície das células apresentadoras de antígeno, ativa neutrófilos, e induz o aumento da ação citolítica das células NK (ABBAS; MURPHY, 1996).

Na LV, a síntese de IFN- γ pode ser modulada por diversos mecanismos envolvendo a resposta Th2 e de células Treg. Estudos têm reforçado que o papel de IL-10 nessa regulação é preponderante em relação às citocinas Th2, visto que a adição de IL-4 não afetou significativamente a produção de IFN- γ , diferentemente do que foi encontrado com a neutralização de IL-10, com a qual foi possível observar um aumento expressivo na secreção de IFN- γ (CARVALHO *et al.*, 1994).

Em estudos com *Leishmania*, foi observado que uma linhagem de camundongos resistentes apresentava controle da infecção através da produção de IFN- γ por linfócitos Th1, enquanto que na linhagem de susceptíveis, a doença tinha caráter progressivo, com predomínio de linfócitos Th2, secretores de IL-4, que inibiam a produção de IFN- γ (SCOTT, 1991; CHATELAIN; VARKILA; COFFMAN, 1992). Um estudo, em camundongos produtores lentos de IFN- γ que apresentavam uma maior susceptibilidade à infecção por *Toxoplasma gondii* em relação àqueles que desenvolveram uma produção precoce dessa citocina, corrobora com a idéia de que a produção precoce de baixos níveis de IFN- γ pode interferir na susceptibilidade à infecção por parasitos intracelulares (YAP *et al.*, 2001).

Pompeu *et al.* (2001) compararam a resposta imune inicial à *L. amazonensis* in vitro - estimulação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) - e in vivo, pós-vacinal, em dois grupos de indivíduos saudáveis, baixos produtores (IFN- γ \leq 160pg/mL) e altos produtores (IFN- γ $>$ 160pg/mL). Após 40 dias da vacinação, observou-se que os baixos produtores permaneciam com reduzida produção de IFN- γ , enquanto os altos produtores exibiam elevados níveis dessa citocina. Seis meses após a vacinação, os dois grupos apresentavam níveis elevados de IFN- γ , demonstrando que indivíduos vacinados

apesar de exibirem uma intensa resposta imunológica mediada por células (IMC), o retardo na elaboração dessa resposta pode influenciar na resistência à infecção por *Leishmania*. CMSP de pacientes infectados por *L. donovani*, ao serem cultivadas com antígeno específico, demonstraram ser incapazes de secretar IFN- γ ou IL-2 (CARVALHO *et al.*, 1994; RAY *et al.*, 2000).

A resposta imunológica Th1 pode ser modulada negativamente pela IL-10. Essa interleucina produzida por macrófagos e células T pode atuar inibindo a ativação de fatores de transcrição ou impedindo a ação de outras citocinas (FIORENTINO *et al.*, 1991). Além disso, favorece a redução da ativação de linfócitos T, através da limitação da secreção de IFN- γ ; da apresentação de antígenos, através da redução da síntese de IL-12, da expressão de moléculas MHC classe II (KOPPELMAN *et al.*, 1997) e das moléculas coestimuladoras das APCs (YANG; MOSSER; ZHANG, 2007). As células Th1 CD4⁺Foxp3⁻CD25⁻, produtoras também de IFN- γ , contribuem mais com a produção de IL -10 que as células Th2, T regulatórias ou células da imunidade inata (TRINCHIERI, 2007)

Tem sido relatado que a neutralização de IL-10 ou a adição de IL-12 às culturas de CMSP de pacientes com LV restaura a resposta imunológica na infecção por *L. chagasi* in vitro (HOLADAY *et al.*, 1993; RIBEIRO DE JESUS *et al.*, 1998). Resultados similares têm sido obtidos em culturas de CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea precoce causada por *L. braziliensis* (duração da doença menor que 60 dias) estimuladas com antígeno de *L. amazonensis*, mostrando que a ação de IL-10 pode modular a resposta Th1 no estágio precoce da infecção por *L. braziliensis* (ROCHA *et al.*, 1999). Na leishmaniose cutânea difusa ativa tem sido observado aumento da expressão de RNA mensageiro de IL-4 e IL-10, e redução da expressão de IFN- γ , sugerindo que IL-10 desempenha função moduladora inibitória da resposta Th1 (BOMFIM *et al.*, 1996).

Foi observado que CMSP de pacientes curados de LV produziam elevadas quantidades de IFN- γ , como também apresentavam síntese de IL-4 e IL-10. Nestas células, a adição de IL-4 ou TGF- β não foi capaz de suprimir a produção de IFN- γ , sendo este fenômeno obtido somente pela adição de α -IL-12 ou IL-10 (KEMP *et al.*, 1993; KEMP *et al.*, 1999; BARCELLAR *et al.*, 2000). Enquanto que, em CMSP de pacientes com LV ativa, a restauração da linfoproliferação e da síntese de IFN- γ foram alcançadas após a

neutralização de IL-10 (CARVALHO *et al.*, 1994; GHALIB *et al.*, 1995). Ghalib *et al.*(1993) demonstraram a presença de RNA mensageiro para IL-10 em células de linfonodos e mononucleares do sangue periférico de pacientes infectados com *L. donovani*, e que, após o tratamento dos mesmos, não foi possível detectar RNA mensageiro para essa citocina. Outro estudo, utilizando células da medula óssea de pacientes com LV, revelou uma diminuição na expressão de RNA mensageiro para IL-10 após tratamento dos mesmos (KARP *et al.*, 1993).

A elaboração da resposta imunológica à *Leishmania* pode resultar em fenótipo Th2 com a secreção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. Essas interleucinas estão envolvidas na proteção contra patógenos extracelulares, mediada pela produção de anticorpos e pela supressão da imunidade celular (COFFMAN *et al.*, 1988; ROMAGNANI, 1997; HEINZEL *et al.*, 1991).

A IL-4 e a IL-13 mostram semelhanças relacionadas às suas atividades biológicas incluindo a produção de IgE, expressão de VCAM-1 (ABEHSIRA-AMAR *et al.*, 1992), estimulação da síntese de imunoglobulinas por células B (VAN VLASSELAER *et al.*, 1992), inibição da síntese de proteínas pró-inflamatórias por monócitos e macrófagos (MINTY *et al.*, 1993; ROMAGNANI, 1997; HART *et al.*, 1999) e da síntese de óxido nítrico por células humanas (SAURA *et al.*, 1996). A única exceção é que IL-13, em contraste com IL-4, não possui capacidade de direcionar a diferenciação dos linfócitos Th0 no fenótipo Th2 (ABEHSIRA-AMAR *et al.*, 1992). Estudos têm encontrado que IL-4 e IL-5, isoladas ou combinadas, não são capazes de responder plenamente pelos efeitos de células Th2 no sítio de inflamação (COHN *et al.*, 1997; BARNER *et al.*, 1998; MCKENZIE *et al.*, 1998; HOGAN *et al.*, 1998), o que sugere a participação de outros mediadores (ZHU, 1999). Camundongos BALB/c deficientes de IL-4 não mostraram alteração da susceptibilidade à infecção por *L. major*, sugerindo possível envolvimento de IL-13 na progressão da doença (NOBEN-TRAUTH; KROPF; MULLER, 1996; NOBEN-TRAUTH; PAUL; SACKS, 1999).

A IL-13 é uma importante proteína imunorregulatória, produzida primariamente por células Th2 ativadas (CHOMARAT; BANCHEREAU, 1998), que está envolvida na maturação da célula B, no aumento da expressão de CD23 e de MHC de classe II (BRIERE

et al., 1993), e na promoção da mudança de isotipo para IgE, em células B humanas (PUNNONEN *et al.*, 1993). Além disso, IL-13 modula negativamente a atividade do macrófago, através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (MINTY *et al.*, 1993; ROMAGNANI, 1996; HART *et al.*, 1999), e diminui a síntese de NO (SAURA *et al.*, 1996).

Na infecção por *Leishmania*, as citocinas Th2 previnem a morte dos parasitos por inibição da ativação macrofágica e da expressão de moléculas coestimuladoras importantes na ativação dos linfócitos. Sendo a IL-13 um fator inibitório da função macrofágica, a sua produção pode ser um mecanismo de evasão da *Leishmania* do sistema imune do hospedeiro. Pelo fato das células T humanas apresentarem receptores funcionais de IL-13, essa citocina pode afetar diretamente a maturação dessas células, causando, possivelmente, um prejuízo na produção de IFN- γ (GAUCHAT *et al.*, 1997).

Bourreau *et al.* (2001) avaliaram a expressão intralésional de citocinas, em pacientes com LCL causada por *L. guyanensis* e observou-se que havia expressão de citocinas Th2, IL-4 e, principalmente, IL-13, nas lesões de todos os pacientes e que a predominância de IL-13, mas não IL-4, induziu estado de não-responsividade a IL-12 em células T CD4⁺ parasito-específicas.

Em humanos, a presença ou ausência da cadeia IL-12R β 2 pode ser um marcador para células Th1 ou Th2, respectivamente (ROGGE *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 1999). A inibição dessa cadeia, que pode ser induzida por IL-13, favorece a condição de não-responsividade à IL-12, levando à persistência da resposta Th2, demonstrando o papel singular de IL-13 na leishmaniose humana.

A estimulação de células mononucleares com antígeno de *L. donovani*, resultou na ausência da produção de IL-12 em pacientes com LV, mas, após o tratamento, a produção desta citocina foi observada (GHALIB *et al.*, 1995). Em células de pacientes curados de LV, a utilização de anticorpos monoclonais contra IL-12 promoveu um bloqueio da produção de IFN- γ . Além disso, em pacientes com doença ativa, a adição de IL-12 teve a capacidade de restaurar *in vitro* a proliferação linfocitária e a produção de IFN- γ (BACELLAR *et al.*, 1996; BACELLAR *et al.*, 2000). Um estudo demonstrou que,

enquanto a adição de IL-12 restaurou a resposta proliferativa e a produção de IFN- γ in vitro, a adição simultânea de IL-12 e IL-10 suprimiu o efeito mediado por IL-12, diminuindo a produção desta citocina para zero, em células estimuladas com antígeno de *Leishmania* (D'ANDREA *et al.*, 1993).

Ji e cols.(2005) estudaram a importância de células Treg no controle da infecção por *L. amazonensis*. Foi percebido um rápido acúmulo de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺ e CD86⁺) após infecção por este parasito, o que se correlacionou a um aumento na expressão de TGF- β , FoxP3 e IL-10 no local da infecção. As células Treg inibiram a ação de células T específicas para *Leishmania*, reduziram a produção de IFN- γ e permitiram o desenvolvimento da doença em camundongos infectados. Entretanto, este padrão positivo para o parasito foi transitório, sugerindo um equilíbrio entre células Treg e efectoras no controle da susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *Leishmania*. Acredita-se que a alteração na ação das células Treg pode exacerbar a manifestação da doença ou controlar a gravidade da imunopatogênese e progressão da doença (JI *et al.*, 2005).

3.2 Estratégias da *Leishmania* para escapar da resposta imunológica

O hospedeiro frente à infecção por *Leishmania* desenvolve uma resposta com mecanismos complexos mediada principalmente pelo sistema imunológico, com o objetivo primordial de defender-se do parasito (LASKAY *et al.*, 1995). No entanto, a *Leishmania* tem sido hábil em evadir-se da resposta imunológica do hospedeiro. Assim, esse parasito utiliza-se de vários mecanismos que lhe permitem invadir, proliferar, disseminar-se e até permanecer nas células do hospedeiro por longo tempo (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005).

A *Leishmania* é identificada como uma das maiores manipuladoras da resposta imunológica inata e adquirida desenvolvida pelo hospedeiro, empregando estratégias que variam de acordo com a espécie envolvida. Esses mecanismos de escape podem interferir no processo da fagocitose, na sinalização celular e nos produtos das funções de macrófagos, inclusive bloqueando a ativação de agentes microbicidas, além de alterar o perfil de citocinas macrofágicas (YANG; MOSSER; ZHANG, 2007). Tais citocinas podem interferir nas vias de sinalização celular, impedindo uma resposta imunológica efetiva (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005; NANDAN *et al.*, 2000; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

3.2.1 Interferência na fagocitose

Após a inoculação da *Leishmania* na pele, o hospedeiro desencadeia uma série de ações para conter e eliminar o parasito. Uma das barreiras de defesa seria os neutrófilos, altos produtores de espécies reativas derivadas do oxigênio, que poderiam ter uma ação eficiente contra a *Leishmania*, porém esses parasitos livram-se da ação dessas células ao serem antecipadamente fagocitados pelos macrófagos (LIMA *et al.*, 1998). Assim, a *Leishmania* manipula a resposta inata do hospedeiro para facilitar sua internalização e sobrevivência nos macrófagos. A invasão da *Leishmania* pode ser favorecida pela sua interação com a matriz extracelular e com proteínas da membrana basal, como a fibronectina (BRITTINGHAM *et al.*, 1999) e a laminina. Essas proteínas são degradadas pela leishmanolisina, uma metaloprotease, e pela cisteína protease B (KULKARNI *et al.*, 2008).

Um elemento importante de defesa contra a infecção por *Leishmania* é o complemento, porém as formas infectantes desse parasito são resistentes à sua ação. O lipofosfoglicano (LPG) é produzido pela *Leishmania*, sendo referido como fator importante na virulência da *L. major* (SPATH *et al.*, 2000). Esse glicoconjugado permite a aposição de C3b (fragmento b da proteína C3 do sistema complemento) na sua superfície, mas bloqueia

a sua ação. O complexo *Leishmania*-C3b liga-se aos receptores macrófágicos Mac-1 (receptor de complemento tipo-3) e CR1 (receptor de complemento tipo-1), favorecendo a sua fagocitose. Enquanto, a glicoproteína 63 (gp63), uma proteinase de superfície dependente de zinco, tem sido citada como protetora da *Leishmania* contra a lise celular, promovendo a clivagem da fração complemento C3b em C3bi e certas enzimas lisossomais (ZAMBRANO-VILLA *et al.*, 2002).

3.2.2 Interferência nas funções dos macrófagos

O principal mecanismo de defesa frente à infecção por *Leishmania* consiste na ativação do macrófago, que depende de estímulos através de citocinas e quimiocinas (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Os macrófagos parasitados por *Leishmania* podem apresentar uma reduzida produção de óxido nítrico e radicais livres derivados do oxigênio em resposta ao estímulo de IFN- γ secretado por linfócitos (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005), devido à desnaturação da fibronectina pelas proteases desse parasito, que conseqüentemente, prolifera no interior desses fagócitos (KULKARNI *et al.*, 2008). Tem sido relatado, que o LPG protege a *Leishmania* da ação dos radicais livres e das enzimas lisossomais do fagolisossomo (ZAMBRANO-VILLA *et al.*, 2002). Outros fatores podem levar a inibição na produção de óxido nítrico, como a IL-10 e o fator de crescimento e transformação β (TGF- β). Esta citocina está relacionada com a inibição da ativação dos macrófagos, induzida pelo IFN- γ , e com a redução da expressão de moléculas do MHC classe II (DING *et al.*, 1990).

A infecção por *Leishmania*, além de inibir as funções de macrófagos, pode determinar a produção de moléculas sinalizadoras com ação imunossupressiva, tais como IL-10 e TGF- β , facilitando a sobrevivência desse protozoário no hospedeiro. TGF- β inibe a atividade microbicida do macrófago e a produção de IFN- γ pelas células NK. Estudo com *L. chagasi* mostrou que esse patógeno estimulou a produção de TGF- β no momento da infecção, favorecendo a inibição da resposta imunológica naquele local (GANTT *et al.*, 2003). Foi observado que CMSP de pacientes com LV, quando estimuladas *in vitro* com

antígeno de *Leishmania*, apresentavam alterações na função macrofágica (HO *et al.*, 1992) e diminuição na expressão de MHCII pelos macrófagos infectados (KWAN *et al.*, 1992).

Alterações na apresentação do antígeno foram detectadas nas infecções por *Leishmania*. Macrófagos infectados por *L. amazonensis* expressaram níveis normais de MHC classe II. Nesse caso, foi sugerido que a alteração na apresentação do antígeno poderia ser devida ao seqüestro de molécula do MHC classe II associada ou não ao antígeno nos fagolisossomos, alterações no posicionamento do antígeno na molécula apresentadora e, ainda, endocitose dessas moléculas pelas próprias leishmanias (DE SOUZA LEÃO *et al.*, 1995; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005).

A IL-10 é uma citocina que favorece a sobrevivência da *Leishmania* no interior dos macrófagos através da inibição da síntese de citocinas, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e da redução da expressão de moléculas MHC classe II. A IL-10 apresenta uma ação supressora sobre a produção de IFN- γ pelos linfócitos T e promove alterações funcionais dos macrófagos, sugerindo que essa citocina prejudica a atividade dos macrófagos em destruir a leishmania (BOGDAN; VODOVOTZ; NATHAN, 1991).

A resposta imunológica mediada por células através de linfócitos Th1 específicos é necessária para controlar a infecção por *Leishmania* em camundongos e humanos (SCOTT, 1991; LASKAY *et al.*, 1995; GAAFAR *et al.*, 1995; CHAN *et al.*, 1999). Este parasito altera a expressão de genes macrofágicos e inibe a resposta Th1, livrando-se da resposta imunológica adquirida do hospedeiro.

3.2.3 Interferência na sinalização celular

A *Leishmania* utiliza várias estratégias para romper o equilíbrio dos mecanismos de sinalização celular, dentre elas a modulação positiva da concentração de cálcio no interior do fagócito, influenciando diversas enzimas da cascata de sinalização celular. Esse

parasito ativa moléculas inibitórias dos eventos da sinalização celular, como a fosfatase SHP-1, limitando a ativação da via através de JAK/STAT (FORGET *et al.*, 2001; YANG; MOSSER; ZHANG, 2007). Tem sido relatado que a infecção por *L. donovani* pode inibir a sinalização através de JAK-2/STAT-1 (RAY *et al.*, 2000).

4. Moléculas moduladoras na ativação do linfócito T

A efetividade da comunicação celular depende da integridade dos elementos envolvidos, inclusive das células apresentadoras de antígenos e das moléculas coestimuladoras.

A resposta das células do sistema imunológico é controlada através do equilíbrio de sinais percebidos por uma grande quantidade de receptores de superfície celular, incluindo receptores de ativação, moléculas coestimuladoras e moléculas inibitórias.

A sinalização através do TCR não é suficiente para a ativação da transcrição gênica, sendo necessária a amplificação desse sinal. Assim, entram em ação as moléculas correceptoras e coestimuladoras. Evidências apontam o envolvimento de receptores da família SLAM e de um grupo de proteínas adaptadoras intracelulares, dentre elas SAP, na regulação da resposta imunológica (ENGEL; ECK; TERHORST, 2003; LATOUR; VEILLETTE, 2004; NICHOLS *et al.*, 2005; VEILLETTE, 2006).

4.1 Molécula sinalizadora na ativação linfocitária (SLAM)

4.1.1 Características

SLAM foi identificada inicialmente em células humanas como IPO-3, uma glicoproteína de superfície celular expressa em células do sistema imunológico

(SIDORENKO; CLARK, 1993; PUNNONEN *et al.*, 1997; CASTRO, 1999) e posteriormente clonada (A12), recebendo a denominação de *Signaling Lymphocytic Activation Molecule* (SLAM) (COCKS, 1995).

A família de receptores relacionados à SLAM é um subgrupo da superfamília das imunoglobulinas de receptores de superfície celular. Além do receptor SLAM (IPO-3, SLAMF1 ou CD150), essa família agrega outros membros como: 2B4 (CD244), Ly-9 (CD229), CD2-like receptor na ativação de células citotóxicas (CRACC, SLAMF7, CD319 ou CS1), CD84, antígenos de linfócitos NK, T e B (SLAMF6 ou NTB-A; Ly108 em camundongos) (ENGEL; ECK; TERHORST, 2003; VEILLETTE; CRUZ-MUNOZ; ZHONG, 2006; MA; NICHOLS; TANGYE, 2007).

SLAM tem peso molecular de 70 kD, sendo constituída por 335 aminoácidos. A sua estrutura compreende uma porção extracelular contendo 202 aminoácidos, uma transmembrana com 22 aminoácidos e outra citoplasmática com 77 aminoácidos. Essa porção citoplasmática apresenta domínio contendo três motivos com resíduos de tirosina: Y281, Y307 e Y327. O motivo que contém o resíduo de tirosina Y281 apresenta uma maior afinidade com SAP, interagindo sem requerer a fosforilação da referida tirosina. Os motivos baseados em tirosina são constituídos de seqüências consenso de aminoácidos: TxYxxV/I, a qual T corresponde à treonina, Y à tirosina, V à valina, I à isoleucina, e x a resíduo de qualquer aminoácido (SAYOS *et al.*, 1998; ROMERO *et al.*, 2005). Esses motivos têm sido denominados de motivos de troca baseados em tirosina dos receptores imunológicos (ITSM) em função de possuírem a capacidade de modular a cascata de sinalização através de ligações diferenciadas com moléculas contendo um domínio SH2, como SAP (SIDORENKO; CLARK, 2003).

A proteína associada à SLAM, o representante da família de adaptadores relacionados à SAP (SAYOS *et al.*, 1998), possui peso molecular de 15 kD, sendo constituída por 128 aminoácidos, um único domínio SH2 e uma extremidade carboxiterminal composta por 24 a 26 aminoácidos. O domínio SH2 apresenta duas superfícies de ligação. Uma das superfícies interage com motivo baseado em tirosina na porção citoplasmática de SLAM através de região contendo a arginina na posição 32 (Arg32) (SAYOS *et al.*, 1998; POY *et al.*, 1999), enquanto a outra, contendo arginina na

posição 78 (Arg78), liga-se ao domínio SH3 da tirosinafosfoquinase (SAYOS *et al.*, 1998; ROMERO *et al.*, 2004; RONCAGALLI *et al.*, 2005).

Foram identificadas quatro isoformas de SLAM, originadas a partir da eliminação seletiva de exons – splicing. Duas delas com 305 aminoácidos, correspondentes ao seguimento transmembrana, outra citoplasmática e uma solúvel (PUNNONEN *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2001). SLAM em forma solúvel é capaz de interagir com SLAM expressa na superfície da membrana celular e influenciar na resposta imunológica.

SLAM tem a capacidade de interagir de forma homotípica com seus domínios extracelulares, porém com baixa afinidade (Kd 200 μ M) (MAVADDAT *et al.*, 2000; ROMERO *et al.*, 2005) e funciona através de sinalização bidirecional após ligações SLAM-SLAM (COCKS *et al.*, 1995; LATOUR *et al.*, 2001).

O vírus do sarampo e outros vírus da família morbilivirus utilizam os receptores SLAM e CD46 para infectar as células, sendo SLAM o principal receptor para aquele vírus (TATSUO *et al.*, 2000; SIDORENKO; CLARK, 2003). No sarampo, as células dendríticas infectadas têm um papel determinante na disseminação viral (KRUSE *et al.*, 2001).

O gene que codifica SLAM localiza-se no braço longo do cromossomo 1, na região 1q22 (THOMPSON *et al.*, 1996), em humanos e camundongos (CHAN *et al.*, 2003; ENGEL; ECK; TERHORST, 2003; LATOUR *et al.*, 2003). Os receptores da família SLAM tem sido implicados na fisiopatologia da autoimunidade. A região Sl e1b confere uma maior susceptibilidade ao lúpus em camundongos e corresponde a região do gene da família SLAM no cromossomo 1 (WANDSTRAT *et al.*, 2004). Polimorfismos na região do gene da família SLAM têm sido associados com o lúpus humano (TSAO *et al.*, 1997; MOSER *et al.*, 1998; SHAI *et al.*, 1999).

4.1.2 Expressão de SLAM

SLAM é expressa em células hematopoiéticas envolvidas na imunidade inata e adquirida (VEILLETTE; LATOUR, 2007), como timócitos, macrófagos, células dendríticas maduras, linfócitos B e T, e plaquetas, em humanos e murinos (PUNNONEN *et al.*, 1997; CASTRO *et al.*, 1999; ROMERO *et al.*, 2004). A expressão dessa molécula foi observada também em células hematopoiéticas da medula óssea e no fígado de fetos murinos (KIEL *et al.*, 2005). A expressão de SLAM na maioria dessas células hematopoiéticas ocorre constitutivamente, sendo induzida rapidamente nos linfócitos T e B nas infecções virais, e nas células dendríticas por estímulos antigênicos (NANDA *et al.*, 2005) e inflamatórios, como lipopolissacáride (LPS) e IL-1 β (KRUSE *et al.*, 2001), e nos macrófagos por LPS e IFN- γ (COCKS *et al.*, 1995; SAYOS *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2004). Tem sido relatada a expressão de SLAM em células do centro germinativo de linfonodos, baço, tonsilas e em uma subpopulação de células endoteliais (SIDORENKO; CLARK, 1993), no entanto, essa expressão não tem sido observada em células NK, monócitos, granulócitos ou células dendríticas imaturas (VEILLETTE; LATOUR, 2007).

Uma maior expressão SLAM pode ocorrer em enfermidades nas quais há uma resposta Th1 exacerbada, como no caso da hanseníase tuberculóide, na qual foi demonstrado que existe uma correlação direta da expressão de SLAM com o perfil de citocinas Th1 (GARCIA, *et al.*, 2001). A expressão de SLAM mostrou-se aumentada em modelos experimentais de lupus em camundongos, revelando o possível envolvimento desse receptor com a autoimunidade (SHAI *et al.*, 1999). Em portadores de artrite reumatóide, associada a altos níveis de imunoglobulina E (IgE), foi detectada uma maior concentração de formas solúveis de SLAM no líquido sinovial em relação aos controles (BLEHARSKI *et al.*, 2001). A análise de linfócitos T CD4⁺ de portadores de esclerose múltipla revelou que essas células apresentam uma maior expressão de SLAM em relação aos controles (FERRANTE *et al.*, 1998).

4.1.3 Ações do SLAM

Os receptores relacionados à SLAM modulam as funções de linfócitos T e B, macrófagos e de células dendríticas maduras (ENGEL; ECK; TERHORST, 2003; LATOUR, 2004; NICHOLS, 2005; VEILLETTE; CRUZ-MUNOZ; ZHONG, 2006; CHAN, 2006; MA; NICHOLS; TANGYE, 2007). A ação dos receptores relacionados à SLAM resulta da fosforilação dessas moléculas por proteínas quinases da família Src, na dependência de suas ligações à SAP (CHEN, 2004). SAP está envolvido na transdução dos sinais intracelulares, exercendo sua ação através da interação do seu domínio SH2 com a cauda citoplasmática de SLAM (ENGEL; ECK; TERHORST, 2003; LATOUR; VEILLETTE, 2004; NICHOLS, 2005; VEILLETTE, 2006). Dessa forma, SAP promove o recrutamento e a ativação enzimática de FynT, induzindo a fosforilação do domínio citoplasmático de SLAM, favorecendo a propagação de eventos da cascata da sinalização (SAYOS *et al.*, 1998; CHAN *et al.*, 2003; LATOUR *et al.*, 2003; VEILLETTE; LATOUR, 2007). A associação de SAP na via de sinalização através de SLAM influencia a resposta imunológica humoral, resultando na produção de IL-4 e formação de centros germinativos; a ativação de células NK humanas; o desenvolvimento de linfócitos NKT e a ativação do regulador de linfócitos T CD8⁺ (MA; NICHOLS; TANGYE, 2007).

SLAM auxilia a adesão entre os linfócitos T e as células apresentadoras de antígenos, participando da formação da sinapse imunológica e da coestimulação na sinalização dependente do TCR (COCKS *et al.*, 1995; MAVADDAT *et al.*, 2000; ENGEL; ECK; TERHORST, 2003). Esse coestimulador também modula a produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas, tendo ações diferenciadas na dependência do tipo de estímulo e coestímulos (MA; NICHOLS; TANGYE, 2007).

A princípio, o papel de SLAM foi investigado através do anticorpo monoclonal anti-SLAM (α -SLAM), identificado como um anticorpo agonista. Esse anticorpo associado ao estímulo de TCR/CD3 em linfócitos T CD4⁺, induzia o aumento da proliferação dessas células e da citotoxicidade de linfócitos T CD8⁺ (HENNING *et al.*, 2001), como também a elevação nos níveis de IFN- γ (COCKS *et al.*, 1995; AVERSA *et al.*, 1997; CASTRO *et al.*,

1999; LATOUR *et al.*, 2001). Assim, α -SLAM regulava a diferenciação de linfócito T CD4⁺, aumentando a produção de IFN- γ , redirecionando a resposta imunológica para um perfil Th1 (COCKS *et al.*, 1995; AVERSA *et al.*, 1997; CASTRO *et al.*, 1999). No entanto, estudo com células de timoma murino, sob estímulo de TCR, mostrou que o efeito da interação SLAM-SLAM foi a redução da produção de IFN- γ (LATOUR *et al.*, 2001). Em estudo com camundongos C57BL/6 deficientes de SLAM, foi mostrado que linfócitos T CD4⁺, ativados através de TCR, apresentaram reduzida produção de IL-4, IL-13 e discreto aumento da produção de IFN- γ . Observou-se ainda que, essa deficiência de SLAM pode afetar a resposta Th1 por prejudicar a função das APCs, visto que macrófagos deficientes de SLAM mostraram reduzida produção de IL-12 sob estímulo de LPS, baixas concentrações de óxido nítrico, reduzida secreção de TNF- α e aumento da produção de IL-6, que podem reduzir a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺. Assim, foi constatado que esses camundongos apresentaram aumento da susceptibilidade à infecção por *L. major* e incapacidade de eliminar esse parasito (WANG *et al.*, 2004), favorecidas pela reduzida produção de IL-12, citocina requerida pelas APCs na montagem da resposta imunológica protetora (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Portanto, SLAM mostrou exercer uma ação estimulatória sobre a resposta Th2 e inibitória sobre a produção de IFN- γ . Além disso, SLAM não é requerido somente para a produção de IL-4, mas também apresenta papel em outros eventos que envolvam a produção de citocinas Th2, como IL-5 e IL-13, tal como ocorre na resposta alérgica (MA; NICHOLS; TANGYE, 2007).

Tem sido demonstrada a importância da coestimulação de SLAM na resposta imunológica à algumas infecções bacterianas, como a hanseníase e a tuberculose. Um estudo mostrou que, em CMSP de pacientes com hanseníase tuberculóide, a expressão de SLAM e a produção de IFN- γ aumentaram após o estímulo com antígeno de *M. leprae* e que a adição de IFN- γ à cultura de CMSP de pacientes com hanseníase virchowiana induz a expressão de SLAM em linfócitos T (GARCIA *et al.*, 2001).

Um estudo que avaliou a participação de SLAM na infecção por HIV mostrou que a via de sinalização através de SLAM, além de potencializar a resposta proliferativa induzida por esse vírus, inibe a produção de IL-10, redirecionando a resposta Th0 para Th1 (MERONI *et al.*, 1999).

Estes resultados discordantes foram, em parte, explicados pela possível ação bloqueadora do α -SLAM (ENGEL; ECK; TERHORST, 2003; MA; NICHOLS; TANGYE, 2007) e à interpretação dos resultados, que atribuiu à SLAM os efeitos obtidos pela ação antagonista do referido anticorpo. É provável, também, que as condições inerentes a cada experimento, como o modelo (murino ou humano), o tipo de célula (linfócito, macrófago ou célula dendrítica), o tipo de estímulo (LPS ou antígeno), o caráter agonista ou antagonista do anticorpo utilizado, tenham contribuído para gerar essas discrepâncias.

Estudos com camundongos deficientes de SAP, SLAM ou proteína quinase mostraram que a via de sinalização através de SLAM-SAP-Tirosinafosfoquinase é importante para induzir a produção de citocinas Th2 em resposta a estímulo através de TCR (DAVIDSON *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006; MA; NICHOLS; TANGYE, 2007).

5. Interação SLAM-SAP-Tirosinafosfoquinase

Para que SLAM possa mediar o sinal intracelular é fundamental a sua ligação à SAP (LATOURET *et al.*, 2003). Em algumas células como macrófagos, linfócitos B e muito provavelmente células dendríticas, a interação de SLAM poderá ocorrer com EAT (ewing's sarcoma – associated transcript)-2 ao invés de SAP (MORRA *et al.*, 2001).

SAP liga-se através do seu domínio SH2, simultaneamente, ao domínio baseado em motivos de tirosina situado na cauda citoplasmática de SLAM e ao domínio SH3 da proteína tirosinafosfoquinase. Essas ligações processam-se em superfícies opostas (RONCAGALLI *et al.*, 2005).

A interação de SAP com SLAM é auxiliada pela arginina na posição 32 (Arg32) presente no domínio SH2. SAP liga-se ao motivo contendo a tirosina na posição 281 (Y281) (SAYOS *et al.*, 1998; POY *et al.*, 1999) presente no domínio citoplasmático de

SLAM. Essa interação ocorre independente da fosforilação de Y281, mostrando que SAP é constitutivamente associado à SLAM (SAYOS *et al.*, 1998). Os motivos contendo tirosina presentes na porção citoplasmática de SLAM são capazes de interagir com SAP, com as fosfatases SHP2 e SHIP, além das proteínas quinases, como tirosinafosfoquinase e Lck (SAYOS *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 1999). Para essa interação com SLAM, SAP compete inibindo a fosfatase SHP2, que contém um domínio SH2 com afinidade pelo mesmo motivo baseado em tirosina em SLAM, deslocando-a. Assim, fica estabelecido o bloqueio, impossibilitando a interação da fosfatase SHP2 com a porção citoplasmática de SLAM (SAYOS *et al.*, 1998; HOWIE *et al.*, 2002a). Na ausência de SAP, SLAM liga-se a essa fosfatase. Essa atuação de SAP mostra o seu caráter de inibidor natural da ligação de SLAM com outras proteínas contendo domínio SH2 (SAYOS *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2003).

Através de outra superfície de ligação no domínio SH2 contendo arginina na posição 78 (Arg78), SAP interage com o domínio SH3 da tirosinafosfoquinase (SAYOS *et al.*, 1998; ROMERO *et al.*, 2004; RONCAGALLI *et al.*, 2005) após vencer a competição com as forças intramoleculares que mantêm essa quinase inativa. SAP simultaneamente associa-se à SLAM e a tirosinafosfoquinase, formando um complexo multiprotéico. Ao recrutar a tirosinafosfoquinase para SLAM, SAP promove a fosforilação desta molécula (CHAN *et al.*, 2003; LATOUR *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2003). Esse complexo formado, SLAM-SAP-Tirosinafosfoquinase, contribuirá para reduzir a produção de IFN- γ (LATOUR *et al.*, 2001; CHAN *et al.*, 2003; LATOUR *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004). Então, o sítio fosforilado em SLAM serve de base para o domínio SH2 de fosfatase contendo inositol (SHIP), que é então fosforilada, e a seguir, liga-se aos adaptadores de proteínas Dok (*docking protein*)- 1, Dok2 e Shc. A proteína Dok2 fosforilada liga-se ao domínio SH2 de RasGAP (LATOUR *et al.*, 2001). A produção de citocinas Th2 poderá ser regulada por esses substratos. Então, SAP regula a resposta imunológica através da via de sinalização de SLAM pelo recrutamento de tirosinafosfoquinase ativa. O resultado dessa via é supressão da produção de IFN- γ e aumento da produção de IL-4. Há relato sugerindo que a associação de SAP à tirosinafosfoquinase acontece tanto constitutivamente quanto de forma induzida, sendo dependente da mudança conformacional que ocorre em SAP conseqüente à sua interação com SLAM (CHEN *et al.*, 2006).

Em camundongos, na presença de SAP, o sinal mediado por SLAM determinou uma inibição seletiva na secreção de IFN- γ durante a ativação do linfócito T, enquanto que na ausência de SAP, SLAM não apresentou impacto significativo na fosforilação intracelular pela proteína quinase ou mesmo no perfil de produção de citocina (VEILLETTE; LATOUR, 2003).

Em modelos de camundongos deficientes em SLAM, Ly108 ou Ly9 mostrou-se alterações na resposta de produção de citocinas Th2, porém essas alterações não foram tão acentuadas quanto aquelas observadas em camundongos deficientes de SAP (WANG *et al.*, 2004; HOWIE *et al.*, 2005; GRAHAM *et al.*, 2006).

A avaliação do envolvimento de SLAM e SAP na produção de citocinas no curso da tuberculose humana demonstrou que a produção de IFN- γ foi diretamente proporcional a expressão de SLAM e inversamente proporcional a expressão de SAP (PASQUINELLI *et al.*, 2004).

A contribuição de SAP na sinalização de SLAM na infecção pelo vírus do sarampo ainda não está estabelecida, porém os portadores da síndrome linfoproliferativa ligada ao X mostraram uma resposta imunológica alterada frente à infecção pelo vírus do sarampo (PURTILO, *et al.* 1977), sugerindo que linfócitos T infectados pelo vírus do sarampo tem sua função prejudicada na deficiência de SAP (MA; NICHOLS; TANGYE, 2007).

6. Interação SLAM-SAP-TCR

Além de participar da modulação da via de sinalização através de SLAM, SAP também está envolvido na sinalização através de TCR, regulando a ativação da proteína quinase C-teta (PKC- θ), Bcl-10 (células de B de linfoma) e NF- κ B (CANNONS 2004 *et al.*; MA; NICHOLS; TANGYE, 2007). SAP é necessário para uma completa ativação de NF- κ B e GATA-3, que são reguladores positivos dos genes das citocinas Th2. Portanto, a

regulação da produção de citocinas Th2 dependente de SLAM poderá ter a participação dos sinais de PKC- θ que levam à ativação de NF- κ B e GATA-3. A produção de citocinas Th2 poderá ser regulada por esses substratos. O aumento da expressão do fator de transcrição GATA-3 resultará no aumento da produção de IL-4, que aciona a resposta Th2, e em redução da produção de IFN- γ (MA; NICHOLS; TANGYE, 2007). Linfócitos T SAP^{-/-} ou fosfoquinase^{-/-} ativados mostram reduzida fosforilação de Bcl-10, que constitui um substrato de PKC- θ (CANNONS *et al.*, 2004).

III. JUSTIFICATIVA

O Brasil enfrenta, faz alguns anos, a expansão e urbanização da leishmaniose visceral com casos humanos e um grande número de cães positivos em várias cidades de grande e médio porte. O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em centros urbanos. Em 19 dos 26 estados brasileiros já foram registrados casos autóctones de LV, representando um importante problema de saúde pública.

O controle da infecção por *Leishmania* é mediado pela resposta imune celular, na qual o IFN- γ tem papel fundamental na ativação dos mecanismos leishmanicidas. Tem sido demonstrado, no modelo murino, que o direcionamento da resposta imune, protetora ou exacerbadora da doença, é definido nos primeiros eventos da sensibilização dos linfócitos pela *Leishmania*. E, que indivíduos saudáveis, sem contato prévio com *Leishmania*, respondem diferentemente ao parasito, com um espectro de produção de IFN- γ , variando dos que não produzem aos que secretam esta citocina em altas concentrações.

Assim, torna-se relevante a necessidade de melhor entender a modulação da resposta imune induzida pela *Leishmania*, para que se possa ter subsídios para a elaboração de medidas, tanto preventivas como as vacinas, quanto terapêuticas. Dessa forma, esse novo conhecimento poderá subsidiar pesquisas que visem à elaboração de vacinas efetivas, adotando uma estratégia anti-Th2 através da fusão do α -SLAM ao antígeno específico, ou a formulação de novas abordagens imunofarmacológicas da terapêutica da leishmaniose.

O presente estudo pode contribuir para um maior esclarecimento da resposta imunológica à infecção por *L. chagasi*, sendo relevante para a elucidação dos mecanismos moduladores dessa resposta imune nos indivíduos baixos produtores de IFN- γ .

IV. HIPÓTESES

1. Hipótese

A *Leishmania chagasi* modula negativamente a produção de IFN- γ através da via de sinalização SLAM

V. OBJETIVOS

1. Geral

Avaliar o papel da via de sinalização de SLAM na modulação da resposta imune em CMSP de indivíduos baixos produtores de IFN- γ , frente à estimulação in vitro por *Leishmania chagasi*.

2. Específicos

Analisar a produção de IFN- γ e IL-10 pelas CMSP de indivíduos baixos produtores estimuladas in vitro com *L. chagasi*, sob bloqueio da via de sinalização de SLAM.

Avaliar a produção de IFN- γ e IL-10 pelas CMSP de indivíduos baixos produtores estimuladas in vitro com *L. chagasi*, sob tratamento com citocinas pró-inflamatórias (rIFN- γ ou rIL-12)

Verificar a produção de IFN- γ e IL-10 pelas CMSP de indivíduos baixos produtores estimuladas in vitro com *L. chagasi*, sob tratamento com citocinas pró-inflamatórias (rIFN- γ ou rIL-12) associado ao bloqueio da via de sinalização de SLAM.

VI. MATERIAL E MÉTODOS

1. Local de execução da pesquisa

Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

2. Definição da população do estudo

A população do estudo compreendeu indivíduos doadores de sangue (21) do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

Foram usados como critérios de inclusão: ter sorologia negativa para Doença de Chagas, Hepatite B, Hepatite C, HIV, HTLV I/II e Sífilis, além de mostrar índice de linfoproliferação para antígeno de *Leishmania* menor ou igual a 4, como descrito previamente (PASQUINELLI *et al.*, 2004). E como critérios de exclusão: ter resposta linfoproliferativa > 4 , para antígenos de *Leishmania*.

3. Procedimentos laboratoriais

3.1. Antígeno

Para a estimulação *in vitro* das CMSP de indivíduos doadores de sangue, utilizou-se *L. chagasi* (MHOM/BR00/MER/STRAIN2), isolada de paciente com LV e caracterizada por anticorpos monoclonais, na forma promastigota viva em fase estacionária de crescimento.

As promastigotas de *L. chagasi* foram cultivadas em meio Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco BRL), 0,2 % de urina humana estéril de doadores masculinos 50 µg/mL de Gentamicina (Gibco BRL). Para o uso no experimento, as promastigotas foram submetidas a três ciclos de lavagem com salina estéril gelada, com centrifugação a 850 g, por 15 minutos a 4 °C e ajustadas para as concentrações de 5×10^7 , 5×10^6 ou 10^6 promastigotas/mL em meio RPMI - 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). A viabilidade da *L. chagasi* foi analisada pela motilidade.

3.2. Preparação das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

Foi coletado creme leucocitário de indivíduos doadores de sangue, cedido pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará (HEMOCE).

As CMSP foram isoladas através de centrifugação por gradiente de densidade em Ficoll - Hipaque (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), a 400 g por 40 minutos a 21 °C, em seguida, foram submetidas a três ciclos de lavagem com salina estéril gelada, com

centrifugação a 350 g, por 15 minutos a 5 °C e ajustadas para as concentrações de 5×10^6 ou 10^6 células/mL em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com 10 mM de HEPES (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 50 µg/mL de gentamicina (Gibco BRL), 100 U/mL de penicilina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 200 µg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) e 10 % de soro AB humano inativado (POMPEU *et al*, 2001).

3.3. Linfoproliferação

Para quantificar a proliferação das CMSP em resposta ao antígeno, estas células foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços, na concentração de 2×10^5 células/poço, e cultivadas, a 37 °C em atmosfera úmida de CO₂ a 5 %, na presença ou na ausência de *L. chagasi* (2×10^5 células/poço) e, após 4 dias, foram adicionadas de [³H]TdR (1µCi/poço) . Com 16 horas de cultivo, as CMSP foram coletadas em filtro e mensurada a incorporação de [³H]TdR através de cintilografia em contador beta.

3.4. Quantificação de Citocinas

As citocinas foram mensuradas baseando-se na metodologia modificada de Garcia e cols (2001), Pasquinelli e cols (2004) e Vilar (2009).

Para a quantificação da produção de IFN-γ e IL-10, as CMSP na concentração de $1,5 \times 10^6$ células/poço foram distribuídas em placas de cultura de 48 poços em volume de 0.3 mL/poço cultivadas a 37 °C em atmosfera úmida de CO₂ a 5 %, na presença ou na

ausência de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço). Após 5 dias, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de IFN- γ .

Para avaliar o efeito da via de sinalização SLAM sobre a produção de IFN- γ e IL-10, as CMSP foram cultivadas, nas mesmas condições descritas acima, na presença ou na ausência de α -SLAM (A12, 10 $\mu\text{g/mL}$: eBioscience, San Diego, CA) e ou de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço). Após 5 dias, os sobrenadantes foram coletados para a análise dos níveis de secreção de IFN- γ e IL-10.

Para avaliar o efeito da via de sinalização SLAM sobre a produção de IFN- γ e IL-10, associado ao tratamento de citocinas pró-inflamatórias, as CMSP foram cultivadas, nas mesmas condições descritas previamente, na presença ou na ausência de rIL-12 (IL-12 recombinante)(concentração final: 500 pg/mL ; Peprotech, México, DF) ou rIFN- γ (interferon- γ recombinante) (concentração final: 7.5 pg/mL ; Chemicon, San Diego, CA), e cultivadas na presença ou na ausência do α -SLAM (A12, 10 $\mu\text{g/mL}$: eBioscience, San Diego, CA) e ou *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço). Após 5 dias, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de IFN- γ e IL-10 (Fluxograma – ANEXO II).

Os níveis de IFN- γ e IL-10 nos sobrenadantes coletados foram quantificados através do método ELISA, utilizando-se Kits BD Opteia TM Set Human IFN- γ e IL-10 (BD Biosciences, San Diego, CA). A metodologia utilizada foi de acordo com as instruções do fabricante.

4. Considerações éticas

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará (COMPEPE) (Protocolo N° 310/2004) (ANEXO I).

5. Análise estatística

Na análise estatística foram usados métodos não paramétricos, sendo utilizado o teste pareado de Wilcoxon para a comparação de dados do mesmo indivíduo, enquanto o teste de Mann Whitney foi empregado para comparações entre grupos de indivíduos. Os dados examinados representam os valores das concentrações das citocinas (IFN- γ e IL-10). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. O programa utilizado para essa análises foi o Software GraphPad Prism versão 4.00 para Windows.

VII. RESULTADOS

1. Definição do perfil imunológico dos indivíduos doadores de sangue

Foram classificados dois grupos de indivíduos com relação à produção de IFN- γ após 5 dias de estimulação *in vitro* com promastigotas vivas de *L. chagasi*, de acordo com os critérios adotados por Pompeu e cols. (2001), definindo como altos produtores de IFN- γ aqueles cujas CMSP produziam concentrações iguais ou superiores a 160 pg/mL (AP) e como baixos produtores de IFN- γ aqueles que produziam concentrações inferiores a 160 pg/mL (BP). A concentração de IFN- γ variou de 0.1 a 10.388,9 pg/mL, com 5 dias de estimulação. O grupo BP teve uma frequência de 61,9 % (13/21). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0.0002$) (Figura 3).

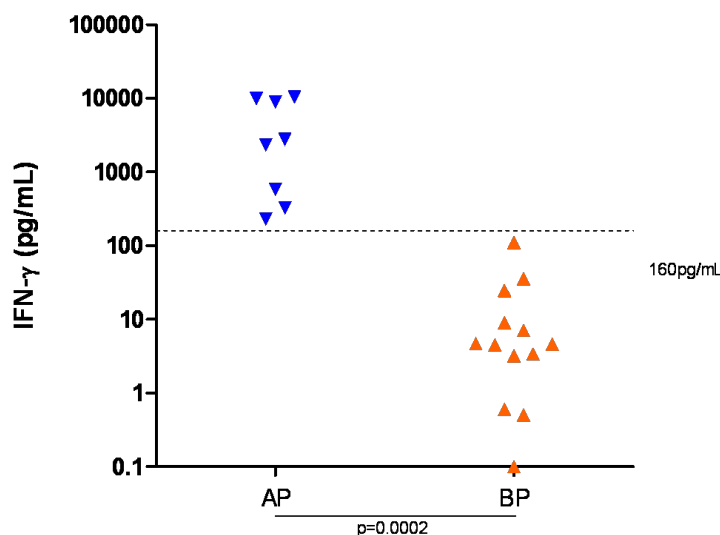
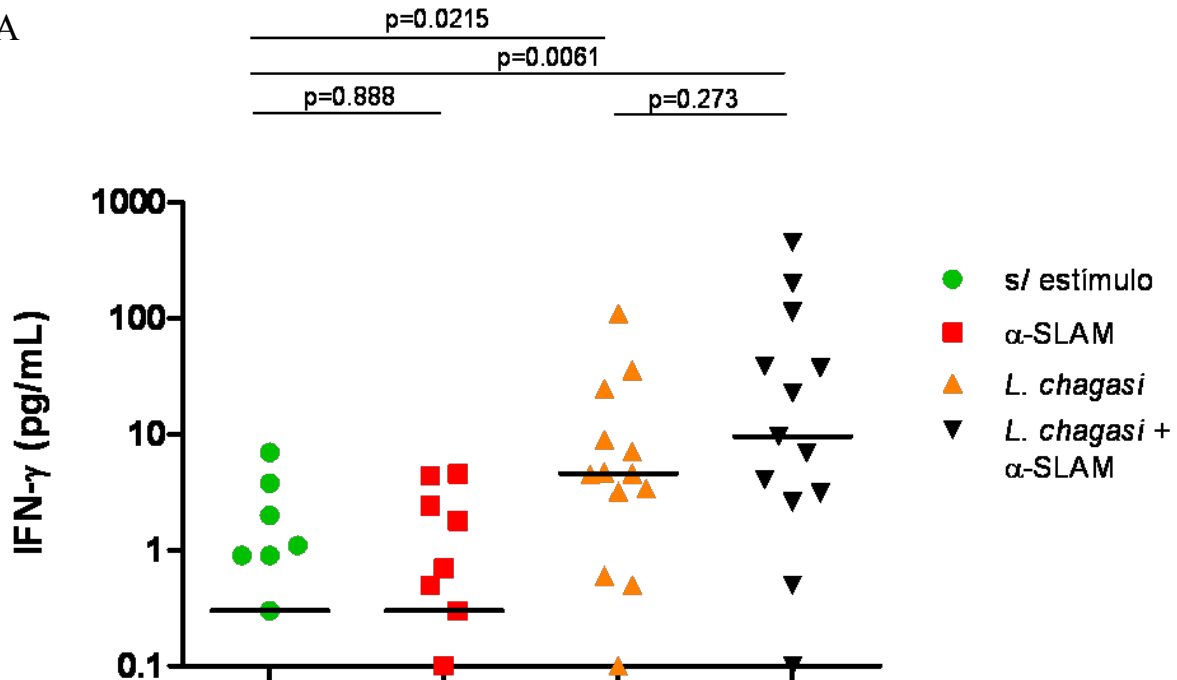


FIGURA 3. Concentrações de IFN- γ utilizadas para separação dos indivíduos nos grupos alto ou baixo produtores. Níveis de IFN- γ obtidas de culturas de células mononucleares de sangue periférico ($1,5 \times 10^6$ cels/poço) de 21 indivíduos estimuladas com promastigotas vivas de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço). Após 5 dias de cultivo, o sobrenadante foi analisado através de ELISA. A barra pontilhada representa o ponto de corte (160 pg/mL) entre altos (AP) e baixos produtores (BP), ($AP \geq 160$ pg/mL, $BP < 160$ pg/mL). O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparação entre os grupos. Valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

Efeito de SLAM sobre a produção de citocinas induzida por *L. chagasi*

Para avaliar o papel de SLAM na resposta imune de indivíduos BP, as CMSP foram cultivadas com promastigotas de *L. chagasi* na presença ou ausência de α -SLAM. Após 5 dias de cultivo, o sobrenadante foi coletado e as amostras foram avaliadas para produção de IFN- γ e IL-10. A estimulação das CMSP com *L. chagasi* foi capaz de promover um aumento significativo da produção de IFN- γ ($p=0.0215$; Figuras 4). *L. chagasi* associado ao bloqueio da via de sinalização SLAM apresentou uma tendência a um aumento na síntese de IFN- γ (Mediana = 9,6), no qual foi possível observar uma produção 2 vezes maior quando comparado ao tratamento isolado com o antígeno (mediana = 4,6; $p=0.273$), o que não foi demonstrado na avaliação de IL-10, em que não existe aumento ($p=0.9097$) (Figura 4B e 5B). Não foi identificada uma correlação entre os padrões de produção de IFN- γ e IL-10, tanto na presença quanto na ausência de α -SLAM (Figura 6). O bloqueio da via de sinalização SLAM, na ausência de estímulo, não alterou a síntese de IFN- γ e de IL-10 quando comparado ao controle negativo ($p=0.843$ e $p=0.635$, respectivamente) (Figura 4A e 5A).

A



B

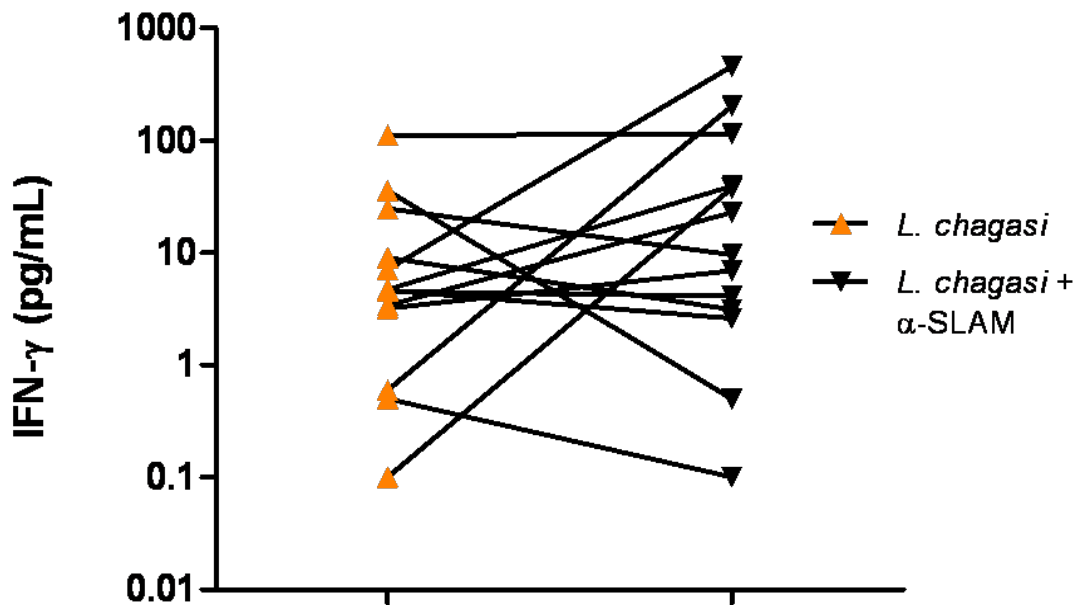
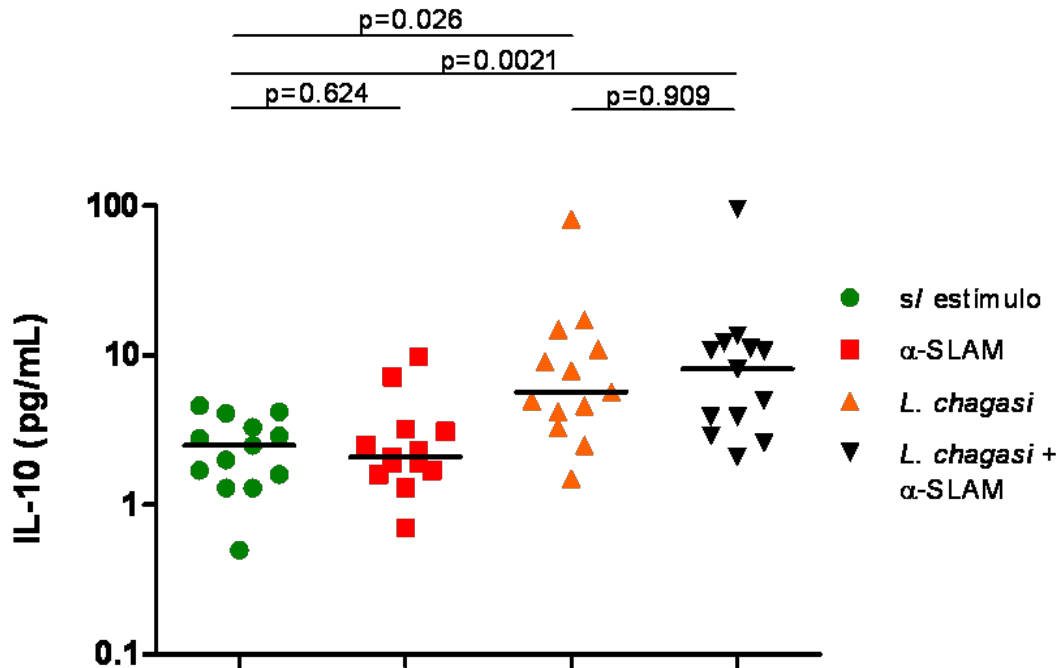


FIGURA 4. Efeito de SLAM sobre a produção de IFN- γ induzida por *L. chagasi*. Células mononucleares de sangue periférico ($1,5 \times 10^6$ cels/poço) de indivíduos baixos produtores (BP) estimuladas com promastigotas vivas de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço), na presença ou ausência de α -SLAM ($10 \mu\text{g/mL}$). Após 5 dias o sobrenadante foi coletado e analisado para produção de IFN- γ através de ELISA. (A) As barras contínuas representam a mediana dos grupos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparação entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. (B) Cada linha conecta dados de um mesmo indivíduo BP.

A



B

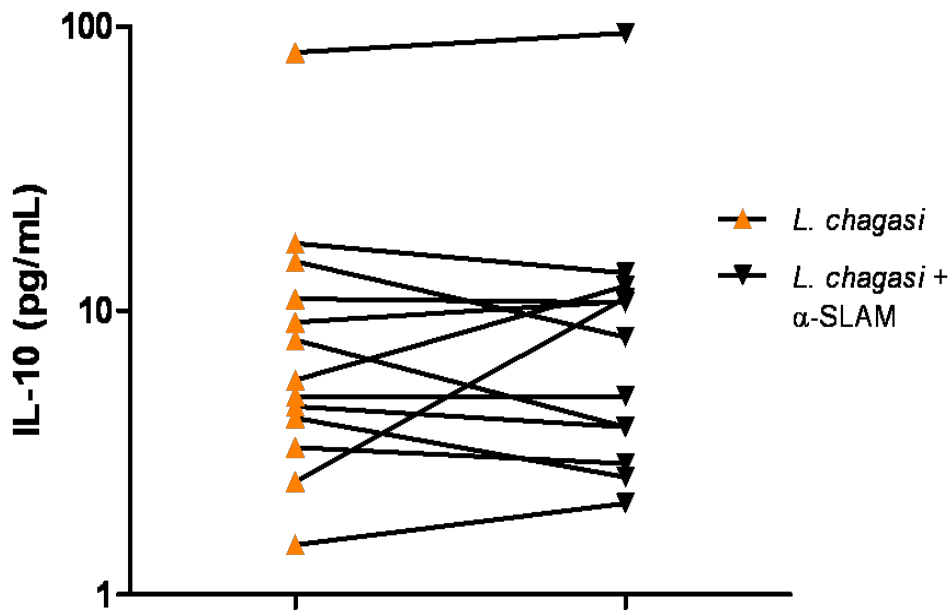
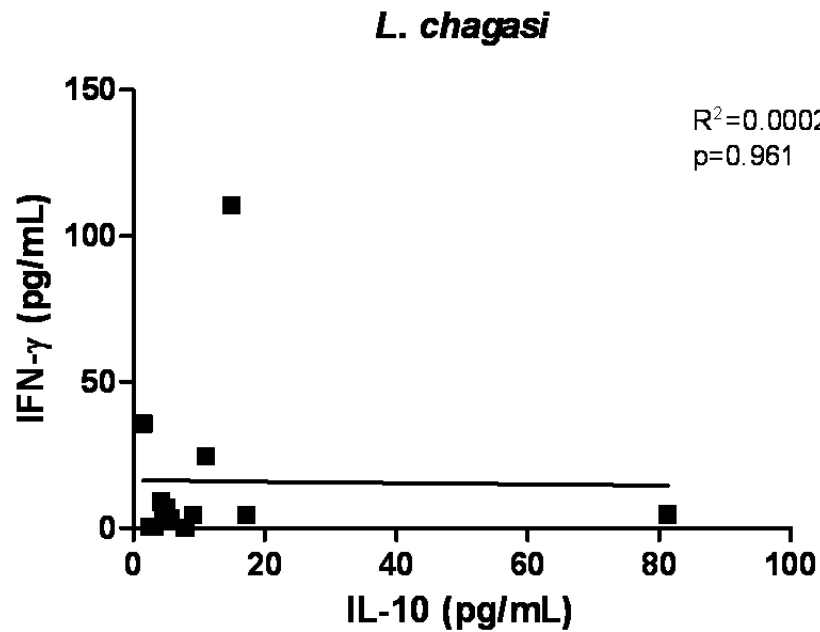


FIGURA 5. Efeito de SLAM sobre a produção de IL- 10 induzida por *L. chagasi*. Células mononucleares de sangue periférico ($1,5 \times 10^6$ cels/poço) de indivíduos baixos produtores (BP) estimuladas com promastigotas vivas de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço), na presença ou ausência de α -SLAM (10 μ g/mL). Após 5 dias o sobrenadante foi coletado e analisado para produção de IL-10 através de ELISA. (A) As barras contínuas representam a mediana dos grupos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparação entre os grupos. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. (B) Cada linha conecta dados de um mesmo indivíduo BP.

A



B

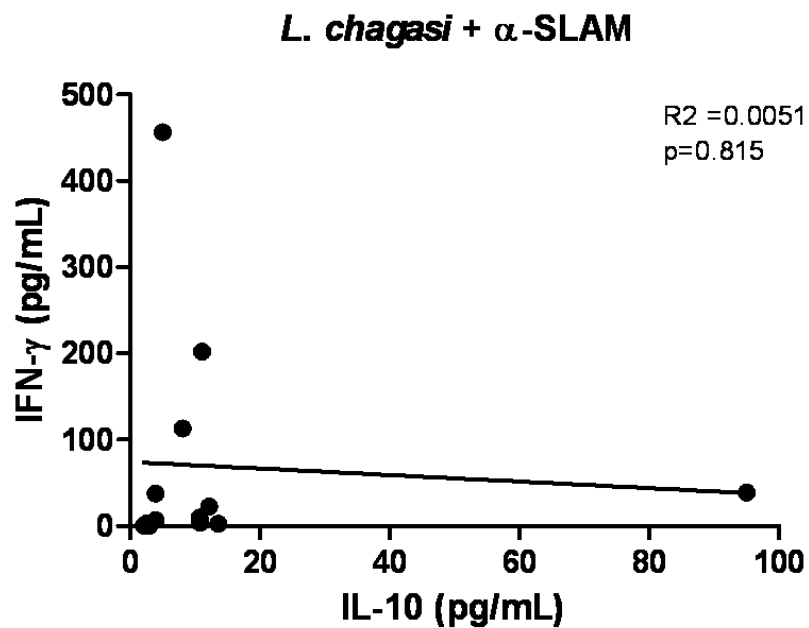


FIGURA 6. Correlação entre IFN- γ e IL-10 induzidos por *L. chagasi* sob bloqueio da via de SLAM. Células mononucleares de sangue periférico ($1,5 \times 10^6$ cels/poço) de indivíduos baixos produtores (BP) foram estimuladas com promastigotas vivas de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço), na ausência (A) ou na presença (B) de α -SLAM (10 μ g/mL). Após 5 dias, o sobrenadante foi coletado e analisado para produção de IFN- γ e IL-10 através de ELISA. As barras contínuas representam a regressão linear [(A) R^2 : 0,0002 e $p=0,961$; (B) R^2 : 0,0051 e $p=0,815$].

Efeito de SLAM sobre a produção de citocinas induzida por *L. chagasi* após tratamento com citocinas próinflamatórias (rIL-12 ou rIFN- γ)

As CMSP de indivíduos sadios BP foram cultivadas sob estímulo de promastigotas vivas de *L. chagasi* na ausência ou na presença de citocinas próinflamatórias (rIL-12 ou rIFN- γ), para avaliar se o bloqueio da via de sinalização SLAM sinergiza a ação destas citocinas. No quinto dia de cultivo, o sobrenadante foi coletado para a quantificação de IFN- γ e IL-10.

O tratamento das CMSP com rIL-12 (500 pg/mL), simultâneo ao estímulo com *L. chagasi*, em relação a adição de antígeno, determinou um aumento significativo na produção de IFN- γ ($p=0.019$), não havendo modificação adicional dessa resposta, quando α -SLAM foi associado, nessas mesmas condições ($p=0.146$) (Figura 7). Com relação à produção de IL-10, não foi observada alteração desta citocina pelas células tratadas com rIL-12, sob estímulo de *L. chagasi* ($p=0.946$), independente do bloqueio da via de sinalização SLAM ($p=0.1099$), quando confrontamos a adição isolada do antígeno (Figura 8). rIL-12 adicionado isoladamente não alterou a produção de IFN- γ ($p=0.496$) e IL-10 ($p=0.587$), quando comparado a ausência de estímulo (Figura 7 e 8). No entanto, quando se adicionou somente rIFN- γ , observou-se um aumento significativo desta citocina ($p=0.0002$) (Figura 9) e de IL-10 ($p=0.068$) (Figura 10).

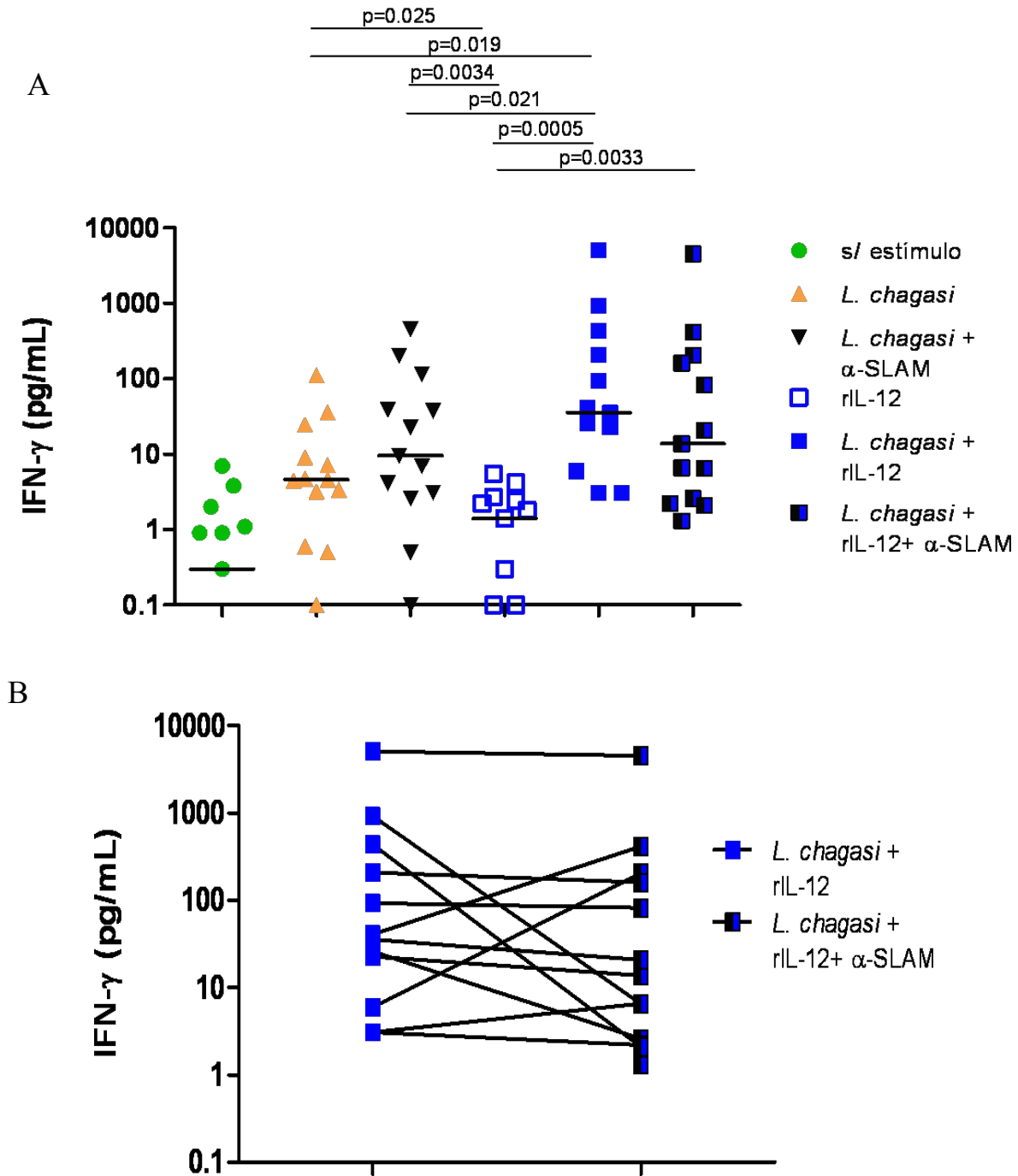


FIGURA 7. Efeito de SLAM sobre a produção de IFN- γ induzida por *L. chagasi*, após tratamento com rIL-12. Células mononucleares de sangue periférico ($1,5 \times 10^6$ cels/poço) de 16 indivíduos baixos produtores (BP) estimuladas com promastigotas vivas de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço), na presença ou ausência de α -SLAM (10 μ g/mL), e tratadas simultaneamente com rIL-12 (500 pg/mL). Após 5 dias o sobrenadante foi analisado para produção de IFN- γ através de ELISA. (A) As barras contínuas representam a mediana dos grupos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparação entre os grupos. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. (B) Cada linha conecta dados de um mesmo indivíduo BP.

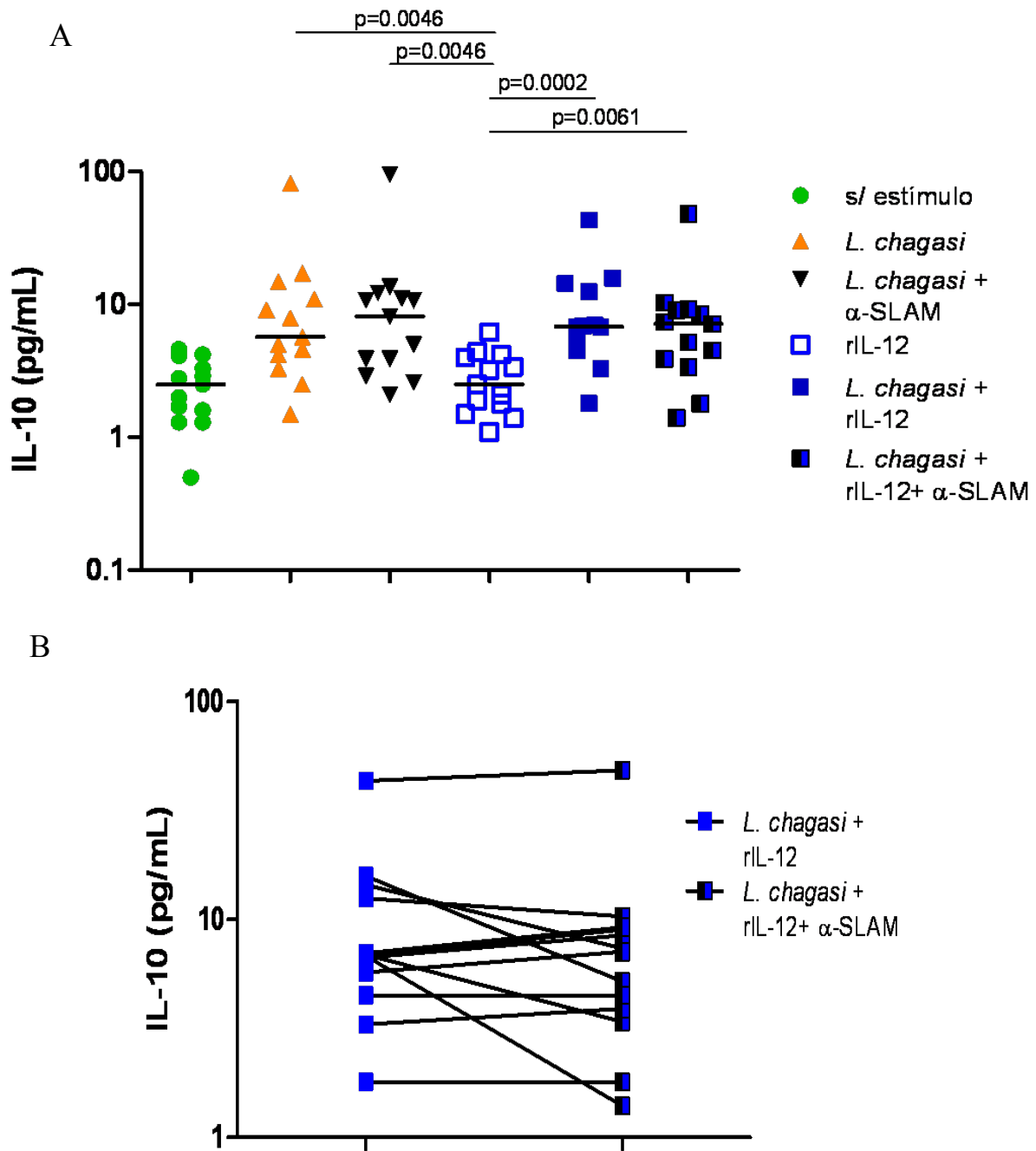


FIGURA 8. Efeito de SLAM sobre a produção de IL-10 induzida por *L. chagasi*, após tratamento com rIL-12. Células mononucleares de sangue periférico ($1,5 \times 10^6$ cels/poço) de 16 indivíduos baixos produtores (BP) estimuladas com promastigotas vivas de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço), na presença ou ausência de α -SLAM (10 μ g/mL), e tratadas simultaneamente com rIL-12 (500 pg/mL). Após 5 dias o sobrenadante foi analisado para produção de IL-10 através de ELISA. (A) As barras contínuas representam a mediana dos grupos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparação entre os grupos. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. (B) Cada linha conecta dados de um mesmo indivíduo BP.

Quando as células foram estimuladas com *L. chagasi* e tratadas com rIFN- γ , houve aumento na secreção desta citocina ($p=0.0002$) e redução de IL-10 ($p=0.0021$) de forma significativa, em relação a estimulação antigênica isolada. α -SLAM associado ao tratamento com rIFN- γ não promoveu um aumento adicional na produção desta citocina ($p=0.129$), como também não modificou a síntese de IL-10 ($p=0.622$) (Figura 9 e 10).

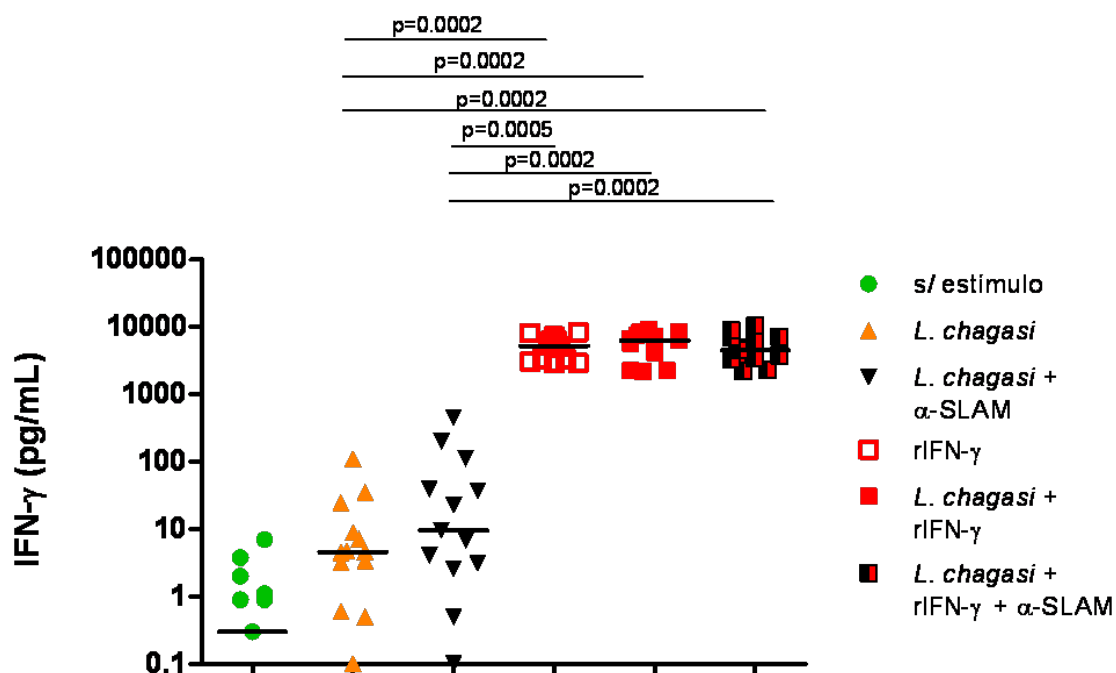


FIGURA 9. Efeito de SLAM sobre a produção de IFN- γ induzida por *L. chagasi* após tratamento com rIFN- γ . Células mononucleares de sangue periférico ($1,5 \times 10^6$ cels/poço) de 16 indivíduos baixos produtores (BP) estimuladas com promastigotas vivas de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço), na presença ou ausência de α -SLAM ($10 \mu\text{g/mL}$), e tratadas simultaneamente com rIFN- γ (7.5 pg/mL). Após 5 dias o sobrenadante foi analisado para produção de IFN- γ através de ELISA. As barras contínuas representam a mediana dos grupos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparação entre os grupos. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

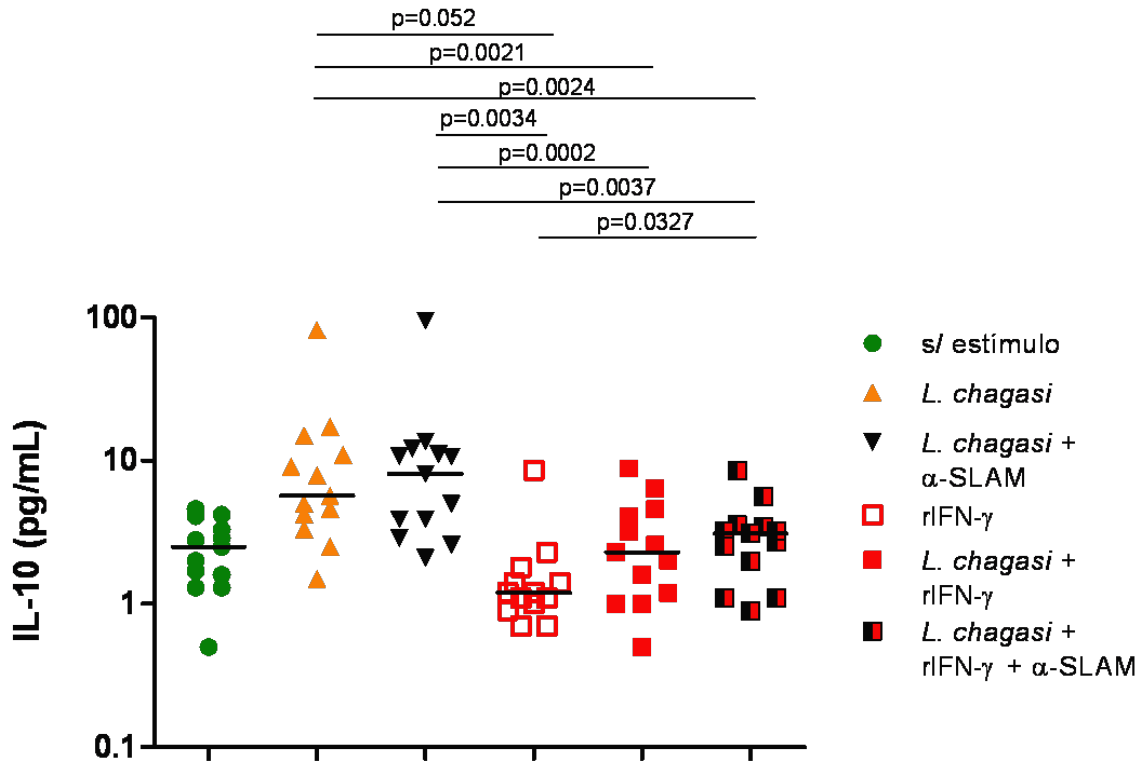


FIGURA 10. Efeito de SLAM sobre a produção de IL-10 induzida por *L. chagasi* após tratamento com rIFN- γ . Células mononucleares de sangue periférico ($1,5 \times 10^6$ cels/poço) de 16 indivíduos baixos produtores (BP) estimuladas com promastigotas vivas de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço), na presença ou ausência de α -SLAM ($10 \mu\text{g/mL}$), e tratadas simultaneamente com rIFN- γ (7.5 pg/mL). Após 5 dias o sobrenadante foi analisado para produção de IL-10 através de ELISA. As barras contínuas representam a mediana dos grupos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparação entre os grupos. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes

VIII. DISCUSSÃO

Proteção e resistência contra todas as formas de leishmanioses dependem da resposta imune mediada por células (BARRAL-NETTO *et al.*, 1997; BARRAL-NETTO *et al.*, 1998). A polarização da resposta imune do hospedeiro contra a *Leishmania* é influenciada por eventos iniciais que ocorrem nos primeiros dias da infecção (VON STEBUT *et al.*, 1998), e o controle da proliferação do parasito no início é fundamental para a resolução da infecção (LASKAY *et al.*, 1995). A resistência à infecção requer uma resposta Th1, que na sua fase inicial é dependente de IL-12 (SCOTT; TRINCHIERI, 1997). A susceptibilidade à *Leishmania* parece ser determinada mais em decorrência da falha na elaboração da resposta Th1, do que ao desenvolvimento da resposta Th2 (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000). A *L. chagasi* induz uma deficiência da produção de IFN- γ , que torna os linfócitos incapazes de ativar macrófagos, além de um aumento de citocinas supressoras da resposta Th1, como IL-4, IL-13, IL-10 e TGF - β , resultando em prejuízo da resposta imune mediada por células (CARVALHO *et al.*, 1988; BACELLAR *et al.*, 1996; ATTA *et al.*, 1998).

Na presente avaliação, na modulação da resposta imune pela adição de rIL-12 associada ao estímulo com *L. chagasi*, foi observado um aumento significativo na produção de IFN- γ . Esses resultados estão de acordo com alguns estudos com CMSP de pacientes com LV que evidenciaram a restauração da resposta imunológica na estimulação *in vitro* com *L. chagasi* pela adição de IL-12 ou pela neutralização de IL-10 (HOLADAY *et al.*, 1993; BACELLAR *et al.*, 1996; RIBEIRO DE JESUS *et al.*, 1998). Barral-Neto e cols. (1998) observaram que a adição de rIL-12 em culturas de CMSP em combinação com antígeno de *Leishmania* restaura a linfoproliferação de forma mais significativa que a adição de α -IL-4 ou α -IL-10. Além disso, camundongos BALB/c infectados com *L. major* e tratados com IL-12 exógena desenvolveram resposta Th1 e cicatrização das lesões (HEINZEL *et al.*, 1993; SYPEK *et al.*, 1993). Em contraposição, foi evidenciado que a ausência de IL-4 e IL-10, bem como a adição exógena de IL-12, não reverteram a produção de IFN- γ na infecção por *L. amazonensis* (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000; JONES *et al.*, 2002). Bourreau *et al.* (2001) encontraram que a adição de rIL-12 em culturas de CMSP de pacientes com LCL, estimuladas com antígeno de *L. guyanensis*, não modificou significativamente a produção de IFN- γ .

Possivelmente essas diferenças de respostas possam estar relacionadas ao fato de um mecanismo inibitório possuir mais de uma via de ativação, a exemplo de IL-4 e IL-13 que mostram superposição em muitas de suas atividades biológicas (COFFMAN et al., 1988; ROMAGNANI, 1997; HEINZEL et al., 1991); ou aos diferentes mecanismos de evasão peculiar a cada espécie de *Leishmania*. Tem sido demonstrado que o efeito inibitório, através do IL-12R β 2, é mais potente com a *L. amazonensis* do que com as outras espécies de *Leishmania* (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000; JONES et al., 2002; BOURREAU et al., 2001; RIBEIRO DE JESUS et al., 1998; HOLADAY et al., 1993; HEINZEL et al. 1993; SYPEK et al., 1993). Em macrófagos, a infecção por *L. chagasi* ou *L. braziliensis* determina a produção de níveis de TGF- β menores que aqueles observados na infecção por *L. amazonensis* (BARRAL et al., 1995).

Nos macrófagos, o IFN- γ estimula os mecanismos microbicidas, induzindo a síntese de óxido nítrico e de espécies reativas derivadas do oxigênio, levando à redução da carga parasitária e ao controle da infecção (MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 1983). Essa ação foi demonstrada em estudos com *Leishmania*, nos quais uma linhagem de camundongos resistentes controlava a infecção, através da produção de IFN- γ por linfócitos Th1, enquanto que nos camundongos susceptíveis, a doença tinha caráter progressivo, com predomínio de linfócitos Th2, secretores de IL-4 e inibidores da produção de IFN- γ (BACELAR et al., 2002). Há evidências indicando que *Leishmania* pode causar alterações da resposta imune com conseqüente supressão de IFN- γ (CARVALHO; TEIXEIRA; JOHNSON, 1981; WILSON et al., 1996).

Observou-se, no presente estudo, que a adição de rIFN- γ , com ou sem antígeno, exerceu um importante efeito na indução de uma resposta Th1 pelas CMSP dos baixos produtores, traduzido pela significativa elevação de IFN- γ . É importante ressaltar que o IFN- γ detectado não é somente o adicionado, mas essencialmente o produzido pelas células, visto que o menor nível detectado foi 2188 pg/mL, enquanto que a adição foi de apenas 7,5 pg/mL. Nossos achados não corroboram com os encontrados em hanseníase por García e cols.(2001) e em tuberculose por Pasquinelli e cols. (2004), em que o tratamento com rIFN- γ associado ao antígeno, *M. leprae* e *M. tuberculosis* respectivamente, não alterou a produção desta citocina. Esta diferença se deve, possivelmente, à metodologia

utilizada pelos dois trabalhos acima citados, na qual as células, após a estimulação inicial com antígeno e rIFN- γ , foram lavadas e recultivadas, sem um novo ajuste na contagem de células viáveis, nem uma nova estimulação com antígeno. Este procedimento pode levar à redução no número de células viáveis, com conseqüente comprometimento da síntese de citocinas.

Corroborando com os achados deste estudo, Carvalho e cols.(1994) trabalhando com CMSP de pacientes com LV demonstraram que houve restauração da resposta linfoproliferativa e da produção de IFN- γ pela adição de rIL-2 e rIFN- γ . Outra investigação revelou que células de linfonodos de camundongos BALB/c, adicionadas de IFN- γ e estimuladas com *L. major*, aumentaram significativamente os níveis de IFN- γ , favorecendo a resposta Th1, enquanto que reduziram as citocinas da resposta Th2, como IL-4 e IL-5 (SCOTT, 1991). Contradizendo os achados anteriores, um estudo utilizando células de linfonodos de camundongos BALB/c, pré-tratadas com rIFN- γ e estimuladas com antígenos de *L. amazonensis*, mostrou que não houve reversão do efeito inibitório sobre a proliferação celular (PINHEIRO *et al.*, 2004).

Na ativação das células T, além do engajamento do TCR, faz-se necessária a modulação desse evento por correceptores, dentre eles as moléculas pertencentes à família SLAM (VEILLETTE; LATOUR, 2003). Estudos avaliando o papel de SLAM na resposta imune, utilizando α -SLAM, assumiam que este anticorpo apresentava papel agonista e mostravam que a sua ligação em CMSP determinava aumento da produção de IFN- γ , favorecendo a polarização para a resposta Th1 (COCKS *et al.*, 1995; AVERSA *et al.*, 1997; CASTRO *et al.*, 1999). A via de sinalização através de SLAM, mediada por SAP, leva à ativação de fatores da transcrição gênica para a produção de citocinas Th2 (IL-4), inibindo a produção de IFN- γ durante a ativação de células T (LATOUR *et al.*, 2001). É possível que o α -SLAM atue como bloqueador da interação de SLAM-SLAM, presente na superfície das células T e das apresentadoras de antígeno. Com isso, possivelmente ocorra uma reversão parcial da resposta Th2 para Th1.

Contribuindo com esse enfoque, experimento usando células dendríticas ativadas, que expressavam constitutivamente SLAM humano, e que foram co-cultivadas com CMSP, demonstrou que a interação SLAM-SLAM reduziu a secreção de IL-12

induzida por CD40L pelas células dendríticas (RETHI *et al.*, 2006), mostrando a função fisiológica de SLAM em promover a resposta Th2. Latour e cols. (2001) comprovaram que a via SLAM é estritamente dependente de SAP e apresenta como resultado final a produção de IL-4.

O bloqueio da via de sinalização de SLAM simula os efeitos da deficiência de SLAM e SAP, visto que a cascata de fosforilação da proteína tirosina desencadeada através dessa via, exerce sua ação somente se SLAM e SAP estiverem disponíveis (LATOURET *et al.*, 2001). Outros trabalhos demonstraram que células T CD4⁺ de camundongos deficientes de SLAM apresentam redução da produção de IL-4 e IL-13 e discreto aumento na produção de IFN- γ (DAVIDSON *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004).

No presente estudo, após a adição de α -SLAM, foi observada uma tendência ao aumento da produção de IFN- γ , frente à estimulação com *L. chagasi*. Isto sugere que o bloqueio da via de sinalização SLAM possivelmente iniba a síntese de IL-4, como visto por Latour e cols. (2001), e de IL-13, como demonstrado por Vilar (2009), e atue indiretamente aumentando a síntese de IFN- γ . Estes achados estão de acordo com estudos, nos quais foram demonstrados que CMSP de pacientes com hanseníase virchowiana ou tuberculose ativa, baixos produtores de IFN- γ , quando estimuladas com antígeno de *M. leprae* ou *M. tuberculosis*, respectivamente, não interferia significativamente na produção de IFN- γ (GARCÍA *et al.*, 2001; PASQUINELLI *et al.*, 2004). Deve-se levar em conta que a amostragem avaliada nos três trabalhos foi pequena, além disso, outro fator importante, que deve ser ressaltado, é que em todos os trabalhos, acima referidos, o bloqueio foi realizado com α -SLAM somente na concentração de 10 μ g/mL.

Como referido anteriormente, neste trabalho, o tratamento com rIFN- γ induziu uma resposta Th1, aumentando a secreção desta citocina. No entanto, não se observou uma ação sinérgica quando se associou rIFN- γ com α -SLAM e *L. chagasi*. Esse achado deve-se, possivelmente, ao fato do rIFN- γ ter induzido as células a atingirem sua capacidade máxima de produção de IFN- γ (Média: 4833pg/mL), e qualquer tratamento adicional não conseguiria mais aumentar essa resposta. Em pacientes com hanseníase virchowiana, a adição de α -SLAM, após estimulação com *M. leprae* e o tratamento com rIFN- γ , resultou em um acréscimo na produção de IFN- γ que atingiu os níveis comparáveis aos obtidos por

pacientes com hanseníase tuberculóide (GARCÍA *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados também em estudo utilizando CMSP de pacientes portadores de tuberculose ativa e classificados como BP (PASQUINELLI *et al.*, 2004). Vale ressaltar que na metodologia adotada por García e cols. (2001) e Pasquinelli e cols. (2004), no recultivo não foi adicionado antígeno, isto pode estar induzindo as células a entrarem em apoptose, o que justificaria a baixa produção de IFN- γ observada nesta condição, enquanto que, no recultivo com α -SLAM, ocorreu aumento desta citocina, possivelmente pelo efeito do bloqueio da via de sinalização SLAM em células pré-ativadas.

Com relação ao tratamento com rIL-12, associado a α -SLAM, observou-se um achado intrigante. Era de se esperar um sinergismo entre o bloqueio da via de sinalização SLAM e a rIL-12, no entanto, verificou-se que ocorreu uma redução do efeito da rIL-12, embora não tenha sido estatisticamente significativa. Nossos dados não corroboram com os dos estudos realizados em pacientes com hanseníase virchowiana (GARCÍA *et al.*, 2001) e tuberculose ativa (PASQUINELLI *et al.*, 2004). Possivelmente pela mesma razão mencionada acima relacionada à metodologia.

Na LV, embora o mecanismo das disfunções imunológicas não esteja completamente esclarecido, admite-se que uma produção exacerbada de citocinas que tenham a capacidade de suprimir a resposta imune celular desempenhe um importante papel na ausência da produção de IFN- γ e na sobrevivência da *Leishmania* no macrófago (ZWINGENBERGER *et al.*, 1990; ATTA *et al.*, 1998). A IL-10 é uma citocina produzida por macrófago, células Th2 e principalmente por Treg, que contribui para a sobrevivência do parasito nessas células (ASKENASY; KAMINITZ; YARKONI, 2008; GREGORI *et al.*, 2007; RONCAROLO *et al.*, 2006). Essa citocina suprime a produção de IFN- γ por células T CD4+, interferindo na atividade leishmanicida do macrófago (CHATELAIN; VARKILA; COFFMAN, 1992).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a IL-10 encontra-se em concentrações elevadas em pacientes com LV ativa e que esta citocina é importante na progressão da doença (BACELAR *et al.*, 2000; CALDAS *et al.*, 2005; NYLEN; SACKS, 2007). Diferentemente do observado na literatura, nossos dados mostraram que a *L. chagasi* induziu baixas concentrações de IL-10. Este resultado possivelmente seja devido ao fato de nossa

amostragem consistir de indivíduos saudáveis, sem contato prévio com *Leishmania*, sendo avaliado no momento do primeiro contato com o antígeno, enquanto que os referidos na literatura são de paciente com a doença ativa, ou seja, com um período mais longo de estimulação pelo parasito. Consistente com isso é o fato de que mesmo em pacientes curados os níveis de IL-10 persistem (CALDAS *et al.*, 2005).

O bloqueio da via de sinalização SLAM não alterou a resposta da IL-10. Resultados semelhantes ao presente estudo foram observados em experimento com células dendríticas, ativadas por CD40L, em que α -SLAM não interferiu na produção de IL-10 (BLEHARSKI *et al.*, 2001). O mesmo foi observado em relação ao tratamento com rIL-12 associada ao α -SLAM. A associação do tratamento com rIFN- γ e α -SLAM causou redução significativa de IL-10. Essa inibição deve-se, possivelmente, ao efeito do tratamento com rIFN- γ , uma vez que não foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre as condições, isolada ou associada ao α -SLAM. Esta não interferência do bloqueio da via de sinalização SLAM, na produção de IL-10, é uma forte evidência de que este efeito é independente de α -SLAM, visto que, seu efeito é eminentemente o de bloqueador de citocinas da resposta Th2 (LATOURET *et al.*, 2001), enquanto que a IL-10 é uma citocina também sintetizada por macrófagos e principalmente por células Treg (ASKENASY; KAMINITZ; YARKONI, 2008; GREGORI *et al.*, 2007; RONCAROLO *et al.*, 2006).

O presente estudo reveste-se de importância por ser o primeiro a avaliar o papel da via de sinalização de SLAM na leishmaniose visceral, trazendo novos e relevantes dados para o enriquecimento da literatura sobre o presente tema que, atualmente, apresenta numerosas lacunas. Dessa forma, este trabalho fornece subsídios para a realização de outros estudos que possibilitem um maior entendimento dos mecanismos que levam à progressão da doença, numa perspectiva de encontrar alternativas terapêuticas e preventivas que sejam capazes de redirecionar a resposta imunológica dos indivíduos BP para uma resposta Th1.

XI. CONCLUSÕES

Em relação à sensibilização *in vitro* de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos sadios baixos produtores de IFN- γ com *Leishmania chagasi*, pode-se concluir que:

- O bloqueio da via de sinalização de SLAM, utilizando α -SLAM na concentração de 10 μ g/mL, não interferiu significativamente na produção de IFN- γ e IL-10, independente do tratamento com citocinas pró-inflamatórias.
- IL-12 recombinante aumenta de forma significativa a produção de IFN- γ , mas não interfere significativamente na produção de IL-10;
- O tratamento com IFN- γ recombinante é capaz de reverter a resposta imune dos indivíduos baixos produtores.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, 383:787-93, 1996.

ABEHSIRA-AMAR, O.; GIBERT, M.; JOLIVY, M.; THEZE, J.; JANKOVIC, D.L.. IL-4 plays a dominant role in the differential development of T_H0 into T_H1 and T_H2 cells. **Journal of Immunology**, 148: 3820-3829, 1992.

ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.; FARMER, M.A.; ANDERSEN, R.A.; ANDERSON, O.R.; BARTA, J.R.; BOWSER, S.S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R.A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T.Y.; KARPOV S, KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C.E.; LEWIS, L.A.; LODGE, J.; LYNN, D.H.; MANN, D.G.; MCCOURT, R.M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.E.; NERAD, T.A.; SHEARER, C.A.; SMIRNOV, A.V.; SPIEGEL, F.W.; TAYLOR, M.F. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. 52(5):399-451; 2005.

AIROLDI, I.; GRI, G.; MARSHALL, J. D.; CORCIONE, A.; FACCHETTI, A.; GUGLIELMINO, R.; TRINCHIERI, G.; PISTOIA, V.. Expression and function of IL-12 and IL-18 on human tonsillar B cells. **Journal of Immunology**, 165, 6880-6888, 2000.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, 18:2993-3002, 1999.

ALVES, J.G.B. CALAZAR. IN: FIGUEIRA, F; FERREIRA, OS; ALVES, JGB. *Pediatria - Instituto Materno infantil de Pernambuco*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Medsi, 320-27, 1996.

ASHFORD, RW. The leishmaniasis as model zoonoses. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 91(7):693-71, 1997.

ASKENASY, N.; KAMINITZ, A.; YARKONI, S. Mechanisms of T regulatory cell function. **Autoimmunity Reviews**, 2008;7(5):370-5.

ATTA, A.M.; D'OLIVEIRA; CORREA, J.; ATTA, M.L.; ALMEIDA, R.P.; CARVALHO, E.M. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 59:426-430,1998.

AVERSA, G.; CHANG, C.C.; CARBALLIDO, J.M.; COCKS, B.G.; DE VRIES, J.E. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. **Journal of Immunology**, 158: 4036-44, 1997.

BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRAL-NETTO, M.; COSTA, C.H.; COFFMAN, R.L.; JOHNSON, W.D.; CARVALHO, E.M. Interleukin-12 restores

interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, 173: 1515-1518, 1996.

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**, 12(8):1228-31, 2000.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; CARVALHO, E.M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, 12: 6734-40, 2002.

BACHMANN, M.F.; KOPF, M. Balancing protective immunity and immunopathology. **Current Opinion in Immunology**, 14: 413-419, 2002.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LOURENÇO, B. A Prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, 154:639-49, 1986.

BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, 64, 2007.

BARNER, M.; MOHRS, M.; BROMBACHER, F.; KOPF, M. Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. **Current Biology**, 2;8(11):669-72, 1998.

BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.. Human leishmaniasis/cytokines; **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**. Jan; 31 (1):149-55, 1998.

BARRAL, A.; TEIXEIRA, M.; REIS, P.; VINHAS, V.; COSTA, J.; LESSA, H.; BITTENCOURT, A.L.; REED, S.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Pathology**, 147(4):947-54, 1995.

BARRAL-NETTO, M.; MACHADO, P.; BITTENCOURT, A.; BARRAL, A. Recent advances in the pathophysiology and treatment of human cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Dermatology**. v. 4, p. 51-58; 1997.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C.A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E.M.; SACKS, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, 420:502-7, 2002.

BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. **Nature**, 453:1051-7, 2008.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nature Immunology**, 8:345-50, 2007.

BLEHARSKI, J.R.; NIAZI, K.R.; SIELING, P.A.; CHENG, G.; MODLIN, R.L. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. **Journal of Immunology**, 167:3174-81, 2001.

BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J. C.. Cellular Responses to Interferon- γ . **Annual Review of Immunology** 15:749-795, 1997.

BOELAERT, M.; CRIEL, B.; LEEUWENBURG, J.; VAN DAMME, W.; LE RAY, D.; VAN DER STUYFT, P. Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 94:465-471, 2000.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOOF, M. - The Immune Response to *Leishmania*: Mechanisms of Parasite Control and Evasion. **International Journal for Parasitology**, 28:121-34, 1998.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. – Macrophage Deactivation by IL-10. **The Journal of Experimental Medicine**, 174:1549-60, 1991.

BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, 84(2), p.188-194, 1996.

BOURREAU, E.; PRÉVOT, G.; PRADNAUD, R.; LAUNOIS, P. Interleukin (IL)-13 is the predominant T_H2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4⁺ T cells unresponsive. **The Journal of Infectious Diseases**, 183:953-959, 2001.

BRASIL/Ministério da Saúde do Brasil. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?Idb2006/d0204.def> (Acesso em 27/Jul/2008).

BRASIL/Ministério da Saúde do Brasil. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?Idb2006/d0204.def> (Acesso em 27/Jul/2008).

BRASIL/Ministério da Saúde, Guia de vigilância Epidemiológica - Secretaria de Vigilância em Saúde; 6ª edição ampliada, p. 455, 2005.

BRASIL/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** - 2. ed. Brasília : Editora MINISTÉRIO DA SAÚDE, p.182, 2007.

BRASIL/Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). 2007 [acesso em julho/2009] Disponível em://www.Saude.gov.br

BRASIL/Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2003.

BRASIL/MS/SESA – Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Informe epidemiológico (12/06/08). Disponível em: www.saude.ce.gov.br. 2008.

BRETSCHER, P.; COHN, M. A theory of self-nonsel self discrimination. **Science**. 11;169(950):1042-9, 1970.

BRIÈRE, F.; BRIDON, J.M.; SERVET, C.; ROUSSET, F.; ZURAWSKI, G.; BANCHEREAU, J. IL-10 and IL-13 as B cell growth and differentiation factors. **Nouvelle Revue Francaise d’Hematologie**, 35(3):233-5, 1993.

BRITTINGHAM, A.; CHEN, G.; MCGWIRE, B.S.; CHANG, K-P.; MOSSER, D.M.. Interaction of *Leishmania* gp63 with Cellular Receptors for Fibronectin. **Infection and Immunity**, 67:4477-84, 1999.

CABRERA, M.A.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.B.; MARZOCHI, M.C.A.; XAVIER, S.C.; SILVA, A.V.; JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 45: 79-83, 2003.

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 Infectious Diseases** 5:113, 2005.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; KATZ, G.; RODAS, L.A.C.; POLETTO, D.W.; LAGE, L.C.; SPÍNOLA, R.M.F.; CRUZ, O.G. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998-1999. **Caderno de Saúde Pública**, 17: 1263-7, 2001.

CANNONS, J.; YU, L.; HILL, B.; MIJARES, L.; DOMBROSKI, D.; NICHOLS, K.; ANTONELLIS, A.; KORETZKY, G.; GARDNER, K.; SCHWARTZBERG, P. SAP regulates TH2 differentiation and PKC-q-mediated activation of NF-kB1. **Immunity**, 21: 693–706, 2004.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R. L.; REED, S. G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, 152, 5949-5956, 1994.

CARVALHO, E.M.; BADAROÓ, R.; REED, S.G.; JONES, T.C.; JOHNSON, W.D. Absence of gamma interferon and Interleukin-2 production during active visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, 76:2066–2069, 1985.

CARVALHO, E.M.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON-JR, W.D. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. **Infection and Immunity**, 33: 498-502, 1981.

CASTRO, A.G.; HAUSER, T.M.; COCKS, B.G.; ABRAMS, J.; ZURAWSKI, S.; CHURAKOVA, T.; ZONIN, F.; ROBINSON, D.; TANGYE, S.G.; AVERSA, G.; NICHOLS, K.E.; DE-VRIES, J.E.; LANIER, L.L.; O'GARRA, A. Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. **Journal of Immunology**, 163: 5860, 1999.

CAVALCANTE, M.H.L. Leishmaniose visceral americana: aspectos clínicos e laboratoriais preditivos de prognóstico. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Estadual do Ceará. 2007.

CHAMBERS, C.A.; ALLISON, J.P. Costimulatory regulation of T cell function. **Current Opinion Cellular Biology**, 11:203-210, 1999.

CHAMBERS, C.A.; KUHNS, M.S.; EGEN, J.G.; ALLISON, J.P. Ctl4-Mediated Inhibition In Regulation Of T Cell Responses: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy. **Annual Review of Immunology**, 19:565–94, 2001.

CHAN, A.Y.; WESTCOTT, J.M.; MOONEY, J.M.; WAKELAND, E.K.; SCHATZLE, J.D. The role of SAP and the SLAM family in autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, 18:656–64, 2006.

CHAN, B.; LANYI, A.; SONG, H.K.; GRIESBACH, J.; SIMARRO-GRANDE, M.; POY, F. Howie D, Sumegi J, Terhorst C, Eck MJ SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. **Nature Cell Biology**, 5: 155–60, 2003.

CHAN, V.J.; SELZER, P.M.; MCKERROW, J.H.; SAKANARI, J.A. Expression and alteration of the S2 subsite of the *Leishmania major* cathepsin B-like cysteine protease. **Biochemical Journal**, 15;340 (Pt 1):113-7, 1999.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR,S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJA, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M.. Visceral leishmaniasis:what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**: 5, S7-S16, 2007.

CHATELAIN, R.; VARKILA, K.; COFFMAN, R.L. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. **Journal of Immunology**, 15;148(4):1182-7, 1992.

CHEN, R.; LATOUR, S; SHI, X.; VEILLETTE, A. Association between SAP and FynT: Inducible SH3 domain-mediated interaction controlled by engagement of the SLAM receptor. **Molecular and Cellular Biology**, 26(15):5559-68, 2006.

CHEN, R.Y.; RELOUZAT, F.; RONCAGALLI, R.; AOUKATY, A.; TAN, R.S.; LATOUR, S.; VEILLETTE, A.. Molecular dissection of 213b4 signaling: Implications for signal transduction by SLAM-related receptors. **Molecular and Cellular Biology**, 24:5144-56, 2004.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K.J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S.M. T Conversion of peripheral CD4+CD25- regulatory T cells by TGF-transcription factor Foxp3. **Journal of Experimental Medicine**, 198:1875–1886, 2003.

CHEN, X.; VODANOVIC-JANKOVIC, S.; JOHNSON, B.; KELLER, M.; KOMOROWSKI, R.; DROBYSKI, W.R. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. **Blood**,110:3804-13, 2007.

CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. **International Reviews of Immunology**, 17(1-4):1-52, 1998.

COCKS, B.G.; CHANG, C.J.; CARBALLIDO, J.M.; YSSEL, H.; DE VRIES, J.E.; AVERSA, G. A novel receptor involved in T-cell activation. **Nature**, 376:260, 1995.

COFFMAN, R.L.; SEYMOUR, B.W.; LEBMAN, D.A.; HIRAKI, D.D.; CHRISTIANSEN, J.A.; SHRADER, B.; CHERWINSKI, H.M.; SAVELKOUL, H.F.; FINKELMAN, F.D.; BOND, M.W; *et al.* The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunological Reviews**, 102:5–28, 1988.

COHN, L.; HOMER, R.J.; MARINOV, A.; RANKIN, J.; BOTTOMLY, K.. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. **Experimental Medicine**, 17;186(10):1737-47, 1997.

CZAR, M.J.; KERSH, E.N.; MIJARES, L.A.; LANIER, G.; LEWIS, GJ.; YAP, G.; CHEN, A.; SHER, A.; DUCKETT, C.S.; AHMED, R.; SCHWARTZBERG, P.L.. Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in X-linked

lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, 98:7449-7454, 2001.

D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **Journal of Experimental Medicine**, 178: 1041-1048, 1993.

DAVIDSON, D.; SHI, X.; ZHANG, S.; WANG, H.; NEMER, M.; ONO, N.; OHNO, S; YANAGI, Y.; VEILLETTE, A. Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in TH2 cytokine regulation. **Immunity**, 21:707-17, 2004.

DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: **Serviço Nacional de Educação Sanitária**, 1956.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Encontro de leishmânias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital**, 45:419-21, 1954. (b)

DEANE, M.P.; DEANE, L.M. Infecção natural do *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em foco de calazar, no Ceará. **O Hospital**, 45:697-702, 1954. (a)

DEDET, J.; PRATLONG, F. Taxonomy of *Leishmania* and geographical distribution of leishmaniasis. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, 127(4):421-4, 2000.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinical Dermatology**, 14: 417-423, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology. Microbiology and Infectious Diseases** 27:305-318, 2004.

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

DE-SOUZA-LEAO, S.; LANG, T.; PRINA, E.; HELLIO, R.; ANTOINE, J.C. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science**; 108:3219-31, 1995.

DING, A.; NATHAN, C.F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D.J.; SRIMAL, S.. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. **Journal of Immunology**, 1;145(3):940-4, 1990.

ENGEL, P.; ECK, M.J.; TERHORST, C. The SAP. and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. **Nature Reviews of Immunology**; 3:813–21, 2003.

EVANS, D.L.; MARSHALL, C.J.; CHRISTEY, P.B.; CARRELL, R.W. Heparin binding site, conformational change, and activation of antithrombin. **Biochemistry**, 22;31(50):12629-42, 1992.

FERRANTE, P.; FUSI, M.L.; SARESELLA, M.; CAPUTO, D.; BIASIN, M.; TRABATTONI, D.; SALVAGGIO, A.; CLERICI, E.; DE-VRIES, J.E.; AVERSA, G.; CAZZULLO, C.L.; CLERICI, M. Cytokine production and surface marker expression in acute and stable multiple sclerosis: Altered IL-12 production and augmented signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-expressing lymphocytes in acute multiple sclerosis. **Journal of Immunology**, 160:1514-21, 1998.

FIorentino, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWANR, M.; O'HARA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, 147:3815-3822, 1991.

FORGET, G.; SIMINOVITCH, K.A.; BROCHU, S.; RIVEST, S.; RADZIOCH, D.; OLIVIER, M. Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. **The European Journal of Immunology**, 31:3185-96, 2001.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Controle, Diagnóstico e Tratamento de Leishmaniose Visceral (Calazar) - Normas Técnicas. Ministério da Saúde, Brasília, 1996.

GAAFAR, A.; KHAZAZMI, A.; ISMAIL, A.; KEMP, M.; HEY, A.; CHISTENSEN, C.B.; DAFALLA, M.; EL-KADORA, A.Y.; EL-HASSAN, A.M.; THEANDER, T.G. - Dichotomy of the T Cell Response to *Leishmania* Antigens in Patients Suffering from Cutaneous Leishmaniasis: Absence or Scarcity of Th1 Activity Is Associated with Severe Infections. **Clinical and Experimental Immunology**.100:239-45, 1995.

GABRIEL, E.M.; LATTIME, E.C. Anti -CTL-Associated Antigen 4: Are Regulatory T Cells a Target? **Clinical Cancer Research**; 13(3), 2007.

GAMA, M.E.; COSTA, J.M.; PEREIRA, J.C.; GOMES, C.M.; CORBETT, C.E. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, 37, 129-136, 2004.

GANTT, K.R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S.M.; NASCIMENTO, E.T.; GOLDMAN, T.L.; RECKER, T.J.; MILLER, M.A.; WILSON, M.E. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. **Journal of Immunology**, 170:2613-20, 2003.

GARCIA, V.E.; CHULUYAN, H. SLAM and CD31: Signaling molecules involved in cytokine secretion during the development of innate and adaptive immune responses. **Cytokine & Growth Factor Review**, 18:85-96, 2007.

GARCIA, V.E.; QUIROGA, M.F.; OCHOA, M.T.; OCHOA, L.; PASQUINELLI, V.; FAINBOIM, L.; OLIVARES, L.M.; VALDEZ, R.; SORDELLI, D.O.; AVERSA, G.; MODLIN, R.L.; SIELING, P.A. Signaling lymphocytic activation molecule expression and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine patterns. **Journal of Immunology**, 167:5719-24, 2001.

GAUCHAT, J.F.; SCHLAGENHAUF, E.; FENG, N.P.; MOSER, R.; YAMAGE, M.; JEANNIN, P.; ALOUANI, S.; ELSON, G.; NOTARANGELO, L.D.; WELLS, T.; EUGSTER, H.P.; BONNEFOY, J.Y. A novel 4-kb interleukin-13 receptor alpha mRNA expressed in human B, T and endothelial cells encoding an alternate type II interleukin-4/interleukin-13 receptor. **European Journal of Immunology**, 27:971-8, 1997.

GHALIB, H.W.; WHITTLE, J.A.; KUBIN, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAN, A.M.; GRABSTEIN, K.H.; TRINCHIERI, G.; REED, S.G. Interleukin-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Immunology**, 154:4623-4629, 1995.

GHALIB, H.W.; PIUVEZAM, M.R.; SKEIKY, Y.A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAN, A.M.; RUSSO, D.M.; REED, S.G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **The Journal of Clinical Investigation**, 92(1):324-9, 1993.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista brasileira de epidemiologia**, 7(3): 338-349, 2004.

GRAHAM, D.B.; BELL, M.P.; MCCAUSLAND, M.M.; HUNTOON, C.J.; VAN-DEURSEN, J.; FAUBION, W.A.; *et al.* Ly9 (CD229)- deficient mice exhibit T cell defects yet do not share several phenotypic characteristics associated with SLAM- and SAP-deficient mice. **Journal of Immunology**, 176:291-300, 2006.

GREEN, S. J.; SCHELLER, L. F.; MARLETTA, M. A.; SEGUIN, M. C.; KLOTZ, F.W.; SLAYTER, M.; NELSON, B. J.; NACY, C. A.. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. **Immunology Letters**; 43, 87-94, 1994.

GREGORI, S.; BACCHETTA, R.; PASSERINI, L.; LEVINGS, M.K.; RONCAROLO, M.G. Isolation, expansion, and characterization of human natural and adaptive regulatory T cells. **Methods in Molecular Biology**, 380:83-105, 2007.

HART, P.H.; BONDER, C.S.; BALOGH, J.; DICKENSHEETS, H.L.; VAZQUEZ, N.; DAVIES, K.V.; FINLAY-JONES, J.J.; DONNELLY, R.P. Diminished responses to IL-13

by human monocytes differentiated in vitro: role of the IL-13R α 1 chain and STAT6. **European Journal of Immunology**, 29:2087-97, 1999.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; MUTHA, S.S.; LOCKSLEY, R.M. Production of interferon-gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4⁺ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, 88, 7011–7015, 1991.

HEINZEL, F.P.; SCHOENHAUT, D.S.; RERKO, R.M.; ROSSER, L.E.; GATELY, M.K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, 1;177(5):1505-9, 1993.

HENNING, G.; KRAFT, M.S.; DERFUSS, T.; PIRZER, R.; DE SAINT-BASILE, G.; AVERSA, G.; FLECKENSTEIN, B.; MEINL, E. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. **European Journal of Immunology**, 31:2741–50, 2001.

HIMMELRICH, H.; LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; BIEDERMANN, T.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOCKSLEY, R.M.; RÖCKEN M, LOUIS JA. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. **Journal of Immunology**; 164(9):4819-25, 2000.

HO, J.L.; BADARO, R.; SCHWARTZ, A.; DINARELLO, C.A.; GELFAND, J.A.; SOBEL, J.; BARRAL, A.; NETTO, M.B.; CARVALHO, E.M.; REED, S.G.; *et al.* Diminished in vitro production of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha during acute visceral leishmaniasis and recovery after therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, 165: 1094-1102, 1992.

HOGAN, S.P.; MATTHAEI, K.I.; YOUNG, J.M.; KOSKINEN, A; YOUNG, I.G.; FOSTER, P.S. A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airways hyperreactivity in BALB/c mice independently of IL-4 and IL-5. **Journal of Immunology**, Aug 1;161(3):1501-9, 1998.

HOLADAY, B.J.; POMPEU, M.M.; EVANS, T.; BRAGA, D.N.; TEXEIRA, M.J.; SOUSA, A.Q.; SADICK, M.D.; VASCONCELOS, A.W.; ABRAMS, J.S.; PEARSON, R.D.; *et al.* Correlates of *Leishmania*-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. **The Journal of Infectious Diseases**, Feb;167(2):4, 1993.

HOWIE, D.; LAROUX, F.S.; MORRA, M.; SATOSKAR, A.R.; ROSAS, L.E.; FAUBION, W.A.; JULIEN, A.; RIETDIJK, S.; COYLE, A.J.; FRASER, C.; TERHORST, C. Cutting edge: the SLAM family receptor Ly108 controls T cell and neutrophil functions. **Journal of Immunology**,174:5931-35, 2005.

HOWIE, D.; OKAMOTO, S.; RIETDIJK, S.; CLARKE, K.; WANG, N.; GULLO, C.. The role of SAP in murine CD150 (SLAM) - mediated T-cell proliferation and interferon γ production. **Blood**, 100:2899-2907, 2002. (b)

HOWIE, D.; SIMARRO, M.; SAYOS, J.; GUIRADO, M.; SANCHO, J.; TERHORST, C.. Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. **Blood**; 99:957-65, 2002. (a)

IKEDA-GARCIA, F.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; FÉLIX-DE-LIMA, V.M.; MORINISHI, C.K.; BONELLO, F.L.; ZANETTE, M.F.; PERRI, S.H.; FEITOSA, M.M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, 143(3-4):254-59, 2007.

JANEWAY, C.A.J.; MEDZHITOV, R.. Innate Immune Recognition. **Annual Review of Immunology**, 20:197–216, 2002.

JERONIMO, S,M,B; OLIVEIRA, R,M; MACKAY, S; COSTA, R,M; SWEET, J; NASCIMENTO, E.T; LUZ, K.G; FERNANDES, M.Z; JERNIGAN, J; PEARSON, R.D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 88:386-8, 1994.

Jl, J., MASTERSON, J.; SUN, J.; SOONG, L. CD4+CD25+Regulatory T Cells Restrain Pathogenic Responses during *Leishmania amazonensis*. **Journal of immunology**, 174:7147–53, 2005.

Jl, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, 71:4278-88, 2003.

JONES, D.E.; ACKERMANN, M.R.; WILLE, U.; HUNTER, C.A.; SCOTT, P.. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. **Infection and Immunity**, 70:2151-58, 2002.

JONES, D.E.; BUXBAUM, L.U.; SCOTT, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of Immunology**, 165:364-72, 2000.

JUDD, B.A.; KORETZKY, G.A. Antigen specific T lymphocyte activation. **Reviews in Immunogenetics**, 2:164-74, 2000.

KARP, C.L.; EL-SAFI, S.H.; WYNN, T.A.; SATTI, M.M.; KORDOFANI, A.M.; HASHIM, F.A.; HAG-ALI, M.; NEVA, F.A.; NUTMAN, T.B.; SACKS, D.L. In vivo

cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **Journal of Clinical Investigation**, 91: 1644-1648, 1993.

KEMP, K.; KEMP, M.; KHARAZMI, A.; ISMAIL, A.; KURTZHALS, J.A.; HVIID, L.; THEANDER, T.G. *Leishmania*-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. **Clinical Experimental Immunology**, 116: 500-504, 1999.

KEMP, M.; KURTZHALS, J.A.; BENDTZEN, K.; POULSEN, L.K.; HANSEN, M.B.; KOECH, D.K.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T.G. *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, 61: 1069-1073, 1993.

KIEL, M.J.; YILMAZ, O.H.; IWASHITA, T.; YILMAZ, O.H.; TERHORST, C.; MORRISON, S.J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. **Cell**, 121(7):1109-21, 2005.

KOPPELMAN, B.; NEEFJES, J.J.; DE-VRIES, J.E.; DE-WAAL; MALEFYT, R. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. **Immunity**, 7:861-871, 1997.

KOTENKO, S.V.; PESTKA, S. Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes. **Nature**, 19, 21(193) (2), 2557-2565, 2000.

KRUSE, M.; MEINL, E.; HENNING, G.; KUHN, C.; BERCHTOLD, S.; BERGER, T.; SCHULER, G.; STEINKASSERER, A. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. **Journal of Immunology**, 167(4):1989-95, 2001.

KULKARNI, M.M.; JONES, A.E.; MCMASTER, W.R.; MCGWIRE, B.S. Fibronectin Binding and Proteolytic Degradation by *Leishmania* and Effects on Macrophage Activation. **Infection and Immunity**; 76:1738-47, 2008.

KWAN, W.C.; MCMASTER, W.R.; WONG, N.; REINER, N.E. Inhibition of expression of major histocompatibility complex class II molecules in macrophages infected with *Leishmania donovani* occurs at the level of gene transcription via a cyclic AMP-independent mechanism. **Infection and Immunity**, 60: 2115-2120, 1992.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and Epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; [S. 1.], 77:569-596, 1983.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 100(8):811-27. Epub 2006 Jan 20; 2005.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J.J. Infective stages of *Leishmania* in the sand fly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 82:421-4, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.. New World leishmaniasis—The Neotropical *Leishmania* species. In: **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, Vol. 5 (F.E.G. Cox, J.P. Kreier and V. Wakelin, eds), pp. 241–266. London: Hodder Arnold, 1998.

LANIER, L.L. Face off — the interplay between activating and inhibitory immune receptors. **Current Opinion in Immunology**, 13:326–331, 2001.

LASKAY, T.; DIEFENBACH A.; ROLLINGHOFF M.; SOLBACH W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, 25(8): 2220–2227, 1995.

LATOUR, S.; GISH, G.; HELGASON, C.D.; HUMPHRIES, R.K.; PAWSON, T.; VEILLETTE, A.. Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. **Nature Immunology**; 2:681–90, 2001.

LATOUR, S.; RONCAGALLI, R.; CHEN, R.; BAKINOWSKI, M.; SHI, X.; SCHWARTZBERG, P. L.; DAVIDSON, D.; VEILLETTE, A.. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signaling in immune regulation. **Nature Cell Biology**; 5, 149-160, 2003.

LATOUR, S.; VEILLETTE, A. The SAP family of adaptors in immune regulation. **Seminars in Immunology**, 16:409–19, 2004.

LE-BON, A.; TOUGH, D.F. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. **Current Opinion in Immunology**; 14:432-436; 2002.

LEVINGS, M.K.; BACCHETTA, R.; SCHULZ, U.; RONCAROLO, M.G. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. **International Archives of Allergy and Immunology**, 129:263-276, 2002;.

LI, C.; IOSEF, C.; JIA, C.Y.; GKOURASAS, T.; HAN, V.K.; SHUN-CHENG, L.S. Disease-causing SAP mutants are defective in ligand binding and protein folding. **Biochemistry**, 42(50):14885-92, 2003.

LIESEA, J.; SCHLEICHERA, U.B.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**; 213, 377–387, 2008.

LIMA, G.M.; VALLOCHI, A.L.; SILVA, U.R.; BEVILACQUA, E.M.; KIFFER, M.M.; ABRAHAMSOHN, I.A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**; 64:145-51, 1998.

MA, C.S.; NICHOLS, K.E.; TANGYE, S.G.. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. **Annual Review of Immunology**; 25:337-79, 2007.

MARZOCHI, M.C. A Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, 63: 82-104, 1992.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, 10:359-75, 1994.

MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, 119(3):237-246, 1999.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, 16(5):188-189, 2000.

MAVADDAT, N.; MASON, D.W.; ATKINSON, P.D.; EVANS, E.J.; GILBERT, R.J.C.; STUART, D.I.; FENNELLY, J.A.; BARCLAY, A.N.; DAVIS, S.J.; BROWN, M.H. Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. **The Journal of Biological Chemistry**. 275:28100-9, 2000.

MCKENZIE, G.J.; BANCROFT, A.; GRENCIS, R.K.; MCKENZIE, A.N. A distinct role for interleukin-13 in T_H2-cell-mediated immune responses. **Current Biology**, 12;8(6):339-42, 1998.

MERONI, L.; FUSI, M.L.; VARCHETTA, S.; BIASIN, M.; RUSCONI, S.; VILLA, M.L.; DE-VRIES, J.E.; AVERSA, G.; GALLI, M.; CLERICI, M. Altered Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM) Expression in HIV Infection and Redirection of HIV-Specific Responses via SLAM Triggering. **Clinical Immunology**, 92: 276-284, 1999.

MINTY, A.; CHALON, P.; DEROCQ, J.M.; DUMONT, X.; GUILLEMOT, J.C.; KAGHAD, M.; LABIT, C.; LEPLATOIS, P.; LIAUZUN, P.; MILOUX, B.; *et al.* Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. **Nature**, 18; 362(6417):248-50, 1993.

MORRA, M.; LU, J.; POY, F.; MARTIN, M.; SAYOS, J.; CALPE, S.; *et al.* Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. **The EMBO Journal**; 20:5840-52, 2001.

MOSER, K.L.; NEAS, B.R.; SALMON, J.; YU, H.; GRAY-MCGUIRE, C.; ASUNDI, N.; BRUNER, G.R.; FOX, J.; KELLY, J.; HENSHALL, S.; BACINO, D.; DIETZ, M.; HOGUE, R.; KOELSCH, G.; NIGHTINGALE, L.; SHAVER, T.; ABDU, N.I.; ALBERT, D.A.; CARSON, C.; PETRI, M.; TREADWELL, E.L.; JAMES, J.A.; HARLEY, J.B. Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, 95: 14869-14874, 1998.

MOSMANN, T. R.; SUD, S.. The expanding universe of T-cell subsets: T_H1, T_H2 and more. **Immunology Today**, 17, 138-146, 1996.

MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, 73:209-212, 2003.

MOTT, K.E.; DESJEUX, P.; MONCAYO, A.; RANQUE, P.; RAADT, P. Parasitoses et urbanization. **Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé**, 69(1):9-16, 1991.

MULLER, I.; COBBOLD, S.P.; WALDMANN, H.; KAUFMANN, S.H. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in vivo depletion of L3T4 β and Lyt-2 β T cells. **Infection and Immunity**, 55:2037-41, 1987.

MURRAY, H.; RUBIN, B.Y.; ROTHERMEL, C.D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes: evidence that IFN- γ is the activating lymphokine. **Journal of Clinical Investigation**; 72, 1506, 1983.

NACY, C.A.; NELSON, B.J.; MELTZER, M.S.; GREEN, S.J.. Cytokines that regulate macrophage production of nitrogen oxides and expression of antileishmanial activities. **Responses on Immunology**, 142: 573-576; 1991.

NANDA, N.; ANDRE, P.; BAO, M.; CLAUSER, K.; DEGUZMAN, F.; HOWIE, D.; CONLEY PB, TERHORST C, PHILLIPS DR. Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. **Blood**. 106: 3028–34, 2005.

NANDAN, D.; KNUTSON, K.L.; LO, R.; REINER, N.E. Exploitation of host cell signaling machinery: activation of macrophage phosphotyrosine phosphatases as a novel mechanism of molecular microbial pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**; 67:464-70, 2000.

NICHOLS, K.E.. Regulation of NKTcell development by SAP, the protein defective in XLP. **Nature Medicine**, 11: 340–45, 2005.

NOBEN-TRAUTH, N.; KROPF, P.; MÜLLER, I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. **Science**, Feb 16;271(5251):987-90, 1996.

NOBEN-TRAUTH, N.; PAUL, W.E.; SACKS, D.L. IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. **Journal of Immunology**, May 15;162(10):6132-40, 1999.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunology**, 28(9):378-84, 2007.

OBST, R.; VAN-SANTEN, H.M.; MATHIS, D.; BENOIST, C. Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4+ T cell response. **The Journal of Experimental Medicine**, 201:1555-1565, 2005.

OLIVIER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, 18(2):293-305, 2005.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. **Advances in Experimental Medical Biology**, 560:11-18; 2005.

PASQUINELLE, V.; QUIROGA, M.F.; MARTINEZ, G.J.; ZORRILLA, L.C.; MUSELLA, R.M.; BRACCO, M.M.; BELMONTE, L.; MALBRÁN, A.; FAINBOIM, L.; SIELING, P.A.; GARCÍA, V.E. Expression of Signaling Lymphocytic Activation Molecule-Associated Protein Interrupts IFN- γ Production in Human Tuberculosis. **Journal of Immunology**. 172, 1177-1185, 2004.

PEARL, J.E.; SAUNDERS, B.; EHLERS, S.; ORME, I.M.; COOPER, A.M. Inflammation and Lymphocyte Activation during Mycobacterial Infection in the Interferon- γ - Deficient Mouse. **Cell Immun.** 211:43-50, 2001.

PEREIRA-NEVES, D.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

PINHEIRO, R.O.; PINTO, E.F.; BENEDITO, A.B.; LOPES, U.G.; ROSSIBERGMANN, B. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 76:519-27, 2004.

POMPEU, M.M.L.; BRODSKYN, C.; TEIXEIRA, M.J.; CLARÊNCIO, J.; VANWEYENBERG, J.; COELHO, I.C.B.; CARDOSO, S. A.; BARRAL, A.; BARRALNETTO, M. Differences in Gamma Interferon Production In Vitro Predict the Pace of the In Vivo Response to *Leishmania amazonensis* in Healthy Volunteers. **Infection and Immunity**, 12,7453-60, 2001.

POY, F.; YAFFE, M.B.; SAYOS, J.; SAXENA, K.; MORRA, M.; SUMEGI, J.; CANTLEY, L.C.; TERHORST, C.; ECK, M.J.. Crystal structures of the XLP protein SAP

reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. **Molecular Cell**, 4(4):555-61, 1999.

PUNNONEN, J.; COCKS, B.G.; CARBALLIDO, J.M.; BENNETT, B.; PETERSON, D.; AVERSA, G.; DE-VRIES, J.E. Soluble and membrane-bound forms of 90 signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, 185:993-1004, 1997.

PURTILO, D.T.; YANG, J.P.; ALLEGRA, S.; DEFLORIO, D.; HUTT, L.M.; SOLTANI, M.; SOLTANI, M.; VAWTER, G. Hematopathology and Pathogenesis of the X-linked recessive lymphoproliferative syndrome. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 62(2):225-33, 1977.

RANGEL, E.F. Transmission of American cutaneous leishmaniasis in peridomestic foci in Rio de Janeiro State and other similar situations compared to the classical epidemiology in Amazon region. In: Proceedings from a Research Seminar on Tropical Diseases, Society and the Environment. v. 2. Geneva: **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases/SAREC**, p. 103-10, 1995.

RAY, M.; GAM, A.A.; BOYKINS, R.A.; KENNEY, R.T. Inhibition of interferon-gamma signaling by *Leishmania donovani*. **Journal of Infectious Diseases**, 3:1121-28, 2000.

RÉTHI, B.; GOGOLÁK, P.; SZATMARI, I.; VERES, A.; ERDÔS, E.; NAGY, L.; RAJNAVÖLGYI, E.; TERHORST, C.; LÁNYI, A. SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, 1;107(7):2821-9, 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 Medicine and Biology Research**, 31:143-8, 1998.

ROCHA, P.N.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; de JESUS, A.R.; CORREIA FILHO, D.; CRUZ FILHO, A.; BARRAL, A.; COFFMANN, R.L.; CARVALHO, E.M. Down-regulation of TH1 type of response in early human american cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.180, p. 1731-1734, 1999.

ROGGE, L.; PAPI, A.; PRESKY, D.H.; BIFFI, M.; MINETTI, L.J.; MIOTTO, D.; AGOSTINI, C.; SEMENZATO, G.; FABBRI, L.M.; SINIGAGLIA, F. Antibodies to the IL-12 receptor b2 chain mark human Th1 but not Th2 cells in vitro and in vivo. **Journal of Immunology**, 162:3926-32, 1999.

ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. **Immunology Today**, 18:263, 1997.

ROMAGNANI, S. Understanding the role of T_{H1}/T_{H2} cells in infection. **Trends in Microbiology**; 4(12):470-3, 1996.

ROMERO, X.; BENÍTEZ, D.; MARCH, S.; VILELLA, R.; MIRALPEIX, M.; ENGEL, P. Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). **Tissue Antigens**, 64(2):132-44, 2004.

ROMERO, X.; ZAPATER, N.; CALVO, M.; KALKO, S.G.; DE LA FUENTE, M.A.; TOVAR, V.; OCKELOEN, C.; PIZCUETA, P.; ENGEL, P. CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocates to the immunological synapse. **Journal of Immunology**, 174:7033-42, 2005.

RONCAGALLI, R.; TAYLOR, J.E.R.; ZHANG, S.; SHI, X.; CHEN, R.; CRUZ-MUNOZ, M.E.; YIN, L.; LATOUR, S.; VEILLETTE, A. Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. **Nature Immunology**, 6:1002-10, 2005.

RONCAROLO, M.G.; GREGORI, S.; BATTAGLIA, M.; BACCHETTA, R.; FLEISCHHAUER, K.; LEVINGS, M.K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunological Reviews**, 212:28-50, 2006.

ROUX, P.P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 68:320-344, 2004.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N.. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews of Immunology**, 2:845-58, 2002.

SAIBIL, S.D.; DEENICK, E.K.; OHASHI PS. The sound of silence: modulating anergy in T lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**, 19:658-64, 2007.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annual Review of Immunology**, 22:531-62, 2004.

SAMELSON, L.E. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. **Annual Review of Immunology**, 20:371-94, 2002.

SAURA, M.; MARTÍNEZ-DALMAU, R.; MINTY, A.; PÉREZ-SALA, D.; LAMAS, S.. Interleukin-13 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in human mesangial cells. **Biochemical Journal**, Jan 15; 313(2):641-6, 1996.

SAYOS, J.; NGUYEN, K.B.; WU, C.; STEPP, S.E.; HOWIE, D.; SCHATZLE, J.D.; KUMAR V, BIRON CA, TERHORST C. Potential pathways for regulation of NK and T

cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. **International Immunology**, 12:1749-57, 2000.

SAYOS, J.; WU, C.; MORRA, M.; WANG, N.; ZHANG, X.; ALLEN, D.; VAN-SCHAIK, S.; NOTARANGELO, L.; GEHA, R.; RONCAROLO, M.G.; OETTGEN, H.; DE-VRIES, J.E.; AVERSA, G.; TERHORST, C. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. **Nature**, 395:462, 1998.

SCHRODER, K.; SWEET, M.J.; HUME, D.A. Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. **Immunobiology**, 211: 511-524, 2006.

SCOTT, P. IFN γ modulates the early development of T_H1 and T_H2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, 147:3149-3155, 1991.

SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. IL-12 as an adjuvant for cell-mediated immunity. **Seminars in Immunology**, 9(5):285-91, 1997.

SHAI, R.; QUISMORIO, F.P.JR., LI, L.; KWON, O.J.; MORRISON, J.; WALLACE, D.J.; NEUWELT, C.M.; BRAUTBAR, C.; GAUDERMAN, W.J.; JACOB, C.O. Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. **Human Molecular Genetics**, 8:639-644, 1999.

SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 91(6):671-83, 1996.

SHTRICHMAN, R.; SAMUEL, C.E. The role of gamma interferon in antimicrobial Immunity. **Current Opinion in Microbiology**, 4:251-259, 2001.

SIDORENKO, S.P.; CLARK, E.A. Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. **Journal of Immunology**, 151:4614-24, 1993.

SIDORENKO, S.P.; CLARK, E.A. The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. **Nature Immunology**, 4(1):19-24, 2003.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.P.; BRAZIL, R.P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 3: 285-91, 2001.

SPATH, G.F.; EPSTEIN, L.; LEADER, B.; SINGER, S.M.; AVILA, H.A.; TURCO, S.J.; Beverley, S.M. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, 97:9258-63, 2000.

SUVAS, S.; KUMARAGURU, U.; PACK, C.D.; LEE, S.; ROUSE, B.T. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. **The Journal of Experimental Medicine**, 198:889-901, 2003.

SYPEK, J.P.; CHUNG, C.L.; MAYOR, S.E.; SUBRAMANYAM, J.M.; GOLDMAN, S.J.; SIEBURTH, D.S.; WOLF, S.F.; SCHAUB, R.G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **The Journal of Experimental Medicine**, 1;177(6):1797-802, 1993.

TATSUO, H.; ONO, N.; TANAKA, K.; YANAGI, Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. **Nature**, 24;406(6798):893-7, 2000.

TEIXEIRA, M.J.; TEIXEIRA, C.R.; ANDRADE, B.B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends Parasitology**, jan;22(1):32-40, 2006.

THOMPSON, A.D.; BRAUN, B.S.; ARVAND, A.; STEWART, S.D.; MAY WA, CHEN E, KORENBERG J, DENNY C. EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. **Oncogene**, 13:2649-58, 1996.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **The Journal of Experimental Medicine**, 204:239-243, 2007.

TSAO, B.P.; CANTOR, R.M.; KALUNIAN, K.C.; CHEN, C.J.; BADSHA, H.; SINGH, R.; WALLACE, D.J.; KITRIDOU, R.C.; CHEN, S.L.; SHEN, N.; SONG, Y.W.; ISENBERG, D.A.; YU, C.L.; HAHN, B.H.; ROTTER, J.I. Evidence for linkage of acadindate chromosome 1 region to human systemic lupus erythematosus. **The Journal of Clinical Investigation**, 99:725-731, 1997.

VALE, E.C.S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 80(4):421-8, 2005.

VEILLETE, A. The SAP family: a new class of adaptor-like molecules that regulates immune cell functions. **Science Signaling**, E8, 2002.

VEILLETTE, A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. **Nature Reviews of Immunology**, 6:56-66, 2006.

VEILLETTE, A.; CRUZ-MUNOZ, M.E.; ZHONG, M.C. SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising. **Trends Immunology**, 27:228-34, 2006.

VEILLETTE, A.; LATOUR S. The SLAM family of immune cell receptors. **Current Opinion in Immunology**, 15:277-85, 2003.

VEILLETTE, A.; LATOUR, S. Consequence of the SLAM-SAP Signaling Pathway in Innate-like and Conventional Lymphocytes. **Immunity**, 27:698-710, 2007.

VELDMAN, C.; NAGEL, A.; HERTL, M. Type I Regulatory T Cells in Autoimmunity and Inflammatory Diseases. **International Archives of Allergy and Immunology**, 140:174-183, 2006.

VILAR, M.L.L.V. Avaliação do mecanismo de modulação da resposta imune à *Leishmania amazonensis* em indivíduos baixos produtores de IFN- γ . Tese apresentada ao Doutorado Curso de Pós-graduação em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, 2009.

VON STEBUT, E.; BELKAID, Y.; JAKOB, T.; SACKS, D.L.; UDEY, M.C. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, Oct 19;188(8):1547-52, 1998.

WANDSTRAT, A.; NGUYEN, E.C.; LIMAYE, N.; CHAN, A.Y.; SUBRAMANIAN, S.; TIAN, X.; YIM, Y.S.; PERTSEMLIDIS, A.; GARNER, H.R.JR.; MOREL, L.; WAKELAND, E.K. Association of extensive polymorphisms in the SLAM/CD2 gene cluster with murine lupus. **Immunity**, 21:769-80, 2004.

WANG, N.; MORRA, M.; WU, C.; GULLO, C.; HOWIE, D.; COYLE, T.; ENGEL, P.; TERHORST, C. CD150 is a member of a family of genes that encode glycoproteins on the surface of hematopoietic cells. **Immunogenetics**, 53:382-94, 2001.

WANG, N.; SATOSKAR, A.; FAUBION, W.; HOWIE, D.; OKAMOTO, S.; FESKE, S.; GULLO, C.; CLARKE, K.; SOSA, M.R.; SHARPE, A.H.; TERHORST, C. The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. **The Journal of Experimental Medicine**, 199:1255-64, 2004.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:
<<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.html>>
<http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html>. Acesso em 09/11/2008.

WHO. Control of leishmaniasis. World Health Organization, Geneva, 1990.

WHO/TDR - SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH & TRAINING IN TROPICAL DISEASES (TDR) - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:
<<http://www.who.int/tdr/svc/publications/about-tdr/30-year-history/making-difference>>. Acesso em 01/11/2008.

WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.; PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, 38(4):147-60, 2005.

WILSON, M.E.; YOUNG, B.M.; DAVIDSON, B.L.; MENTE, K.A.; MCGOWAN, S.E. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, 161(11):6148-55, 1998.

WILSON, M.E.; SANDOR, M.; BLUM, A.M.; YOUNG, B.M.; METWALI, A.; ELLIOTT, D.; LYNCH, R.G.; WEINSTOCK, J.V. Local suppression of IFN in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. **Journal of Immunology**, 156: 2231-2239, 1996.

WU, C.; NGUYEN, K.B.; PIEN, G.C.; WANG, N.; GULLO, C.; HOWIE, D.; SOSA, M. R.; EDWARDS, M. J.; BORROW, P.; SATOSKAR, A.R.. SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of T_H2 cells. **Nature Immunology**, 2, 410-414, 2001.

YAMAMURA; M.; UYEMURA, K.; DEANS, R.J.; WEINBERG, K.; REA, T.H.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, 254:277, 1991.

YANG, Z.; MOSSER, D.M.; ZHANG, X. Activation of the MARK, following *Leishmania amazonensis* infection of Macrophages. **Journal of Immunology**, 178:1077-85, 2007.

YAP, G.; ORTMANN, R.; SHEVACH, E.; SHER, A. A heritable defect in IL-12 signaling in B10.Q/J mice. II. Effect on acute resistance to *Toxoplasma gondii* and rescue by IL-18. **Journal of Immunology**, 166, 5720-5725, 2001.

YOSHIDA, A.; TAKAHASHI, H.K.; NISHIBORI, M.; IWAGAKI, H.; YOSHINO, T.; MORICHIKA, T.; YOKOYAMA, M.; KONDO, E.; AKAGI, T.; TANAKA, N.. IL-18-Induced Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 in Human Monocytes: Involvement in IL-12 and IFN- γ Production in PBMC. **Cellular Immunology**, 210:106-115; 2001.

ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J.C.; ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade The Immune Response. **Trends Parasitol** , 18:272-8, 2002.

ZHANG, M.; GONG, J.; PRESKY, D.H.; XUE, W.; BARNES, P.F.. Expression of the IL-12 receptor b1 and b2 subunits in human tuberculosis. **Journal of Immunology**; 162:2441-7, 1999.

ZHU, Z.; HOMER, R.J.; WANG, Z.; CHEN, Q.; GEBA, G.P.; WANG, J.; ZHANG, Y.; ELIAS, J.A.. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. **The journal of Clinical Investigation**, 103(6):779-88, 1999.

ZWINGENBERGER, K.; HARMS, G.; PEDROSA, C.; OMENA, S.; SANDKAMP, B.; NEIFER, S. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production. **Clinical Immunology Immunopathology**, 57: 242-249, 1990.

ANEXO I

TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO COMPLEXO HOSPITALAR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (COMEPE) - Protocolo N°310/2004



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 703/04

Fortaleza, 26 de novembro de 2004

Protocolo COMEPE n° 310/04

Pesquisador responsável: Maria do Livramento Leitão Vilar

Dept°./Serviço: Hospital Universitário Walter Cantídio/HUWC/UFC

Título do Projeto: "Avaliação da produção de IFN- γ e expressão de moléculas sinalizadoras na ativação de linfócitos na Leishmaniose tegumentar americana (LTA)"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n°196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução n° 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 25 de novembro de 2004.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,

Mirian Parente Monteiro.

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/HUWC/UFC

ANEXO II

FLUXOGRAMA. Para avaliar o efeito do bloqueio da via de SLAM sobre a produção de IFN- γ e IL-10, as CMSP na concentração de $1,5 \times 10^6$ células/poço foram distribuídas em placas de cultura de 48 poços em volume de 0.3mL/poço cultivadas a 37°C em atmosfera úmida de CO₂ a 5%, na presença ou na ausência de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ promastigotas/poço), e na presença ou na ausência de α -SLAM (A12, 10 μ g/mL; eBioscience, San Diego, CA), associado ou não ao tratamento de citocinas pró-inflamatórias [(IL-12 recombinante-concentração final: 500pg/mL; Peprotech, México, DF) ou (IFN- γ recombinante-concentração final: 7.5pg /mL; Chemicon, San Diego, CA)]. Após 5 dias, os sobrenadantes foram coletados para a análise dos níveis de secreção de IFN- γ e IL10.

