



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

ZIRLANE CASTELO BRANCO COELHO

**AVALIAÇÃO IN VITRO DOS MECANISMOS IMUNOSSUPRESSORES
INDUZIDOS POR *Leishmania amazonensis* NA RESPOSTA IMUNE
DE INDIVÍDUOS SADIOS**

FORTALEZA

2004

ZIRLANE CASTELO BRANCO COELHO

**AVALIAÇÃO IN VITRO DOS MECANISMOS IMUNOSSUPRESSORES
INDUZIDOS POR *Leishmania amazonensis* NA RESPOSTA IMUNE
DE INDIVÍDUOS SADIOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Margarida Maria Lima Pompeu

FORTALEZA

2004

ZIRLANE CASTELO BRANCO COELHO

**AVALIAÇÃO IN VITRO DOS MECANISMOS IMUNOSSUPRESSORES
INDUZIDOS POR *Leishmania amazonensis* NA RESPOSTA IMUNE DE
INDIVÍDUOS SADIOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Data da Aprovação: 30/09/ 2004

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Margarida Maria Lima Pompeu (Orientadora)
Universidade Federal da Ceará

Profa. Dra. Aldina Maria Prado Barral
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Talapala Govindaswamy Naidu
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Cristina de Souza Chaves
Universidade Federal do Ceará

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Gerardo e Elrizem**, que com seu amor, tantos esforços empenharam para me possibilitar vencer vários obstáculos e conseguir a realização profissional.

Aos meus **irmãos**, pelo incentivo e amizade.

Aos meus **sobrinhos**, pela ajuda, dedicação e compreensão recebidas de todas as formas possíveis.

AGRADECIMENTOS

- À Prof.^a Dr.^a. Margarida Maria Lima Pompeu por ter sido mais do que orientadora, foi minha amiga, confiou e acreditou em mim, me apoiou nos momentos de incertezas. Seus conselhos e ensinamentos muito influenciarão em minha carreira profissional.
- À Dr.^a. Maria Jânia Teixeira, pela sua amizade, sugestões e apoio no desenvolvimento deste trabalho, principalmente por dedicar vários dias de suas férias para colaborar na elaboração de gráficos e análise estatística.
- Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, do Departamento de Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela imensa ajuda dada ao trabalho experimental.
- À Dr.^a. Aldina Barral, da Fundação Osvaldo Cruz (Salvador-BA), por permitir a realização de grande parte dos experimentos deste trabalho no Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunologia (LIMI) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – BA.
- Ao Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra, pela gentileza em colaborar, cedendo espaço no laboratório e reagentes para a realização de eletroforeses em gel.
- À Prof.^a. Dr.^a. Silvia Helena Baren Rabenhorst pelo fornecimento de alguns reagentes que muito auxiliaram no trabalho experimental.
- À Dr.^a. Cristiane Maria Milanezi pela eficiente ajuda técnica no laboratório do Departamento de Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- À Lucineide e Herivaldo, pelo ajuda técnica no desenvolvimento prático deste trabalho.
- À Érika Freitas Mota e a Mércia Sindeaux Frutuoso, por colaborarem na realização dos experimentos.

- Ao HEMOCE, Setor de Distribuição e Fracionamento, pelo fornecimento das bolsas de creme leucocitário, em especial às Dr^{as}. Josineire Freitas Pimentel e Eliane Márcia Cunha da Silva.
- Aos meus amigos da SBAC-Ce (Dr^a. Magui Jaborandy Rodrigues, Dr. Jose Antonio Perez Silveira, Dr. Manoel Alves Maia Filho, Dr^a. Maria de Jesus Lima do Nascimento (Majé), Dr. Francisco Einstein do Nascimento, Dr^a. Maria Iracema de Aguiar Patrício), pelo carinho e incentivo constantes.
- Aos colegas do Laboratório Central do Hospital Universitário Walter Cantídio, pela compreensão nas situações em que estive ausente.
- Aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal, pelo zelo em prestar qualquer espécie de assistência, em especial, às secretárias Paula da Paz Palácio e Francileide Paiva de Oliveira..
- Aos colegas professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, que de alguma maneira colaboraram com esse trabalho.
- À CAPES, através do projeto PROCAD, pela importante ajuda financeira para a realização da parte experimental.
- Ao Núcleo de Medicina Tropical, através do seu coordenador, Prof^{or}. Dr. Ivo Castelo Branco Coêlho, pela delicadeza em ceder suas dependências, computador e demais apoios muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Estudos anteriores mostraram que indivíduos expostos à *Leishmania amazonensis* apresentam resposta diferenciada em relação à produção de IFN γ . Aqueles com baixa produção geram uma resposta Th2 e os que apresentam alta produção desta citocina, desde as primeiras horas de infecção, uma resposta Th1. Com o objetivo de avaliar o mecanismo de supressão induzido por *L. amazonensis*, foi determinado o perfil e a cinética da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas, como também de citocinas em culturas de células mononucleadas do sangue periférico de indivíduos saudáveis, estimuladas com promastigotas vivas de *L. amazonensis*. A análise semiquantitativa da expressão de RNAm das quimiocinas e seus receptores, através de RT-PCR, e a quantificação das citocinas foi determinada por ELISA, após 12 horas, 48 horas e 120 horas de infecção. Verificaram-se dois padrões de resposta em relação à secreção de IFN γ . Indivíduos com produção superior a 145,8 pg/mL foram classificados como alto respondedor (AR) e aqueles com produção inferior, como baixo respondedor (BR). Observou-se no grupo AR o desenvolvimento de uma resposta mista, com predomínio de Th1. Esta resposta está associada à expressão de quantidades relevantes de MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MCP-1(CCL2), IP-10 (CXCL10), IL-8 (CXCL8), CCR1, CCR2 e CXCR3 em 12 e 48 horas de infecção. IL-12, IL-13 e IL-10 foram observadas em altas concentrações. Em relação ao grupo BR, observou-se diminuição da expressão de MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MCP-1(CCL2), I-309 (CCL1), CCR2, CXCR3 e CCR5 durante todo o período avaliado e de IP-10 (CXCL10) nas primeiras 48h de infecção. IL-10 e IL-13 encontravam-se em elevadas concentrações desde 12h, tendo um pico de produção com 48h de infecção. Os resultados sugerem que após 48 horas de exposição é o momento em que há diferenciação na expressão das moléculas. IL-10 e IL-13 parecem ter papel relevante na modulação da supressão de IFN γ induzida nos BR por *L. amazonensis*.

ABSTRACT

Previous studies have shown that individuals exposed to *Leishmania amazonensis* respond differentially with regard to interferon gamma (IFN) γ production. Individuals who have a low production of IFN γ develop a Th2 response, while those who produce high amounts of this cytokine during the early stages of infection show the Th1 response. In order to evaluate the mechanism of suppression induced by *L. amazonensis*, the profile and kinetics of chemokines and their receptors were determined, as also the cytokines in the cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy individuals, stimulated with live promastigotes of *L. amazonensis*. A semiquantitative analysis of mRNA expression for the chemokines and their receptor was performed by RT-PCR, and the cytokines were quantified by ELISA, at 12, 48 and 120 hours after infection. The two patterns of IFN γ response were studied. Individuals with a production higher than 145,8 pg/mL were classified as high responders (HR), and those with lower levels of production were considered as low responders (LR). Individuals in the HR group developed a mixed response, with a predominance of Th1, which was associated with the expression of relevant quantities of MIP-1 α , RANTES, MCP-1, IP-10, IL-8, CCR1, CCR2 and CXCR3, within 12 and 48 hours after infection. IL-12, IL-13 and IL-10 were observed in significant quantities. In the LR group, the suppression of expression of MIP-1 α , RANTES, MCP-1, I-309, CCR2, CXCR3 and CCR5 during the entire period of study, and that of IP-10 during the first 48 hours of infection, was observed. IL-10 and IL-13 were found in elevated concentrations from 12 hours of infection onwards, with a peak production at 48 hours. These results suggest that the pattern of response apparently is defined around 48 hours of infection. IL-10 and IL-13 appear to exercise a relevant role in the modulation of suppression of IFN γ , induced in the LR group by *L. amazonensis*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Produção de IFN γ nos sobrenadantes das CMSP infectadas por <i>L. amazonensis</i> em 120 horas pós-infecção nos grupos Alto Respondedor (AR) e Baixo Respondedor (BR).....	38
FIGURA 2 –	Análise semi-quantitativa da expressão de RNAm das quimiocinas MIP-1 α , RANTES, MCP-1 e MIP-1 β , através de RT-PCR de CMSP de indivíduos sadios estimuladas com <i>L. amazonensis</i>	40
FIGURA 3 –	Análise semiquantitativa da expressão de RNAm das quimiocinas IP-10, MIG, IL-8 e I-309, através de RT-PCR de CMSP de indivíduos sadios estimuladas com <i>L. amazonensis</i>	42
FIGURA 4 –	Análise semiquantitativa da expressão de RNAm das quimiocinas CCR1, CCR2, CXCR3, CCR5 e CCR4, através de RT-PCR de CMSP de indivíduos sadios estimuladas com <i>L. amazonensis</i>	45
FIGURA 5 –	Análise da produção de citocinas IFN γ , IL-10, IL-12 e IL-13 nos sobrenadantes de culturas de CMSP estimuladas com <i>L. amazonensis</i> após 12, 48 e 120 de infecção.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Quimiocinas da família C, seus receptores e células que expressam o receptor.....	28
TABELA 2 - Quimiocinas da família CXC, seus receptores e células que expressam o receptor.....	29
TABELA 3 - Quimiocinas da família CX3, seus receptores e células que expressam o receptor.....	29
TABELA 4 - Quimiocinas da família CC, seus receptores e células que expressam o receptor.....	30

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 -	Quantificação de IFN γ nos sobrenadantes de culturas de CMSP, de indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	67
APÊNDICE 2 -	Quantificação de MIP-1 α no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	67
APÊNDICE 3 -	Quantificação de RANTES no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	68
APÊNDICE 4 -	Quantificação de MCP-1 no RNAm de culturas de CMSP de e indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas s vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de e infecção.....	68
APÊNDICE 5 -	Quantificação de MIP-1 β no RNAm de culturas de CMSP, de e indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	69
APÊNDICE 6 -	Quantificação de IP-10 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	69
APÊNDICE 7 -	Quantificação de MIG no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	70

APÊNDICE 8 -	Quantificação de IL-8 no RNAm de culturas de CMSP, de e indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas s vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	70
APÊNDICE 9 -	Quantificação de I-309 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	71
APÊNDICE 10 -	Quantificação de CCR1 no RNAm de culturas de CMSP, de e indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	71
APÊNDICE 11 -	Quantificação de CCR2 no RNAm de culturas de CMSP, de e indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	72
APÊNDICE 12 -	Quantificação de CXCR3 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas s vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	72
APÊNDICE 13 -	Quantificação de CCR5 no RNAm de culturas de CMSP, de e indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	73
APÊNDICE 14 -	Quantificação de CCR4 no RNAm de culturas de CMSP, de e indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	73

APÊNDICE 15 -	Quantificação de IL-12 nos sobrenadantes de culturas de e CMSP, de indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	74
APÊNDICE 16 -	Quantificação de IL-13 nos sobrenadantes de culturas de CMSP, de indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	74
APÊNDICE 17 -	Quantificação de IL-10 nos sobrenadantes de culturas de CMSP, de indivíduos sadios, AR e BR, estimuladas com promastigotas vivas de <i>L. amazonensis</i> , com 12, 48 e 120 horas de infecção.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
LTA	Leishmaniose Tegumentar americana
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
Th	Célula T auxiliar
IFNγ	Interferon gama
IL	Interleucina
NK	Célula <i>natural killer</i>
CAA	Célula apresentadora de antígeno
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TGFβ	Fator transformador do crescimento beta
CRTh2	Receptor de prostaglandina D2
MIG	Monocina induzida pelo IFN γ
IP-10	Proteína 10 induzida pelo IFN γ
MCP	Proteína quimiotática de monócito
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
RANTES	<i>"Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted"</i>
CMSP	Células mononucleadas do sangue periférico
SBF	Soro bovino fetal
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Dioxinucleotídeo-trifosfato
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
BSA	Soroalbumina bovina
STF	Salina tamponada com fosfato
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE APÊNDICES.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Leishmaniose.....	18
1.2 Parasitas de Maior Ocorrência no Brasil.....	21
1.3 A Resposta Imune.....	22
1.3.1 Citocinas e as Respostas Th1 e Th2.....	23
1.3.2 Quimiocinas e as Respostas Th1 e Th2.....	26
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Geral.....	31
2.2 Específicos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Parasito e Antígeno.....	32
3.2 Isolamento das Células Mononucleadas do Sangue Periférico.....	32
3.3 Ensaio de Linfoproliferação.....	33
3.4 Coleta das Amostras.....	33
3.5 Extração de RNAm e Síntese de c-DNA.....	34
3.6 Detecção de RNAm para Quimiocinas e Receptores de Quimiocinas	34
3.7 Seqüência de <i>Primers</i> e Tamanho das Quimiocinas.....	35
3.8 Seqüência de <i>Primers</i> e Tamanho dos Receptores de Quimiocinas	35
3.9 Quantificação das Citocinas.....	36
3.10 Análise Estatística.....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Produção de IFN γ como Critério de Divisão dos Grupos.....	38
4.2 Análise da Expressão de Quimiocinas.....	39
4.3 Análise da Expressão de Receptores de Quimiocinas.....	43
4.4 Produção de Citocinas.....	47

5 DISCUSSÃO.....	48
6 CONCLUSÕES	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICES.....	67

- C621a Coêlho, Zirlane Castelo Branco
Avaliação in vitro dos mecanismos imunossupresores induzidos por *Leishmania amazonensis* na resposta imune de indivíduos sadios. / Zirlane Castelo Branco Coêlho. – Fortaleza, 2004.
75 f.
Orientadora: Profa. Dra. Margarida Maria Lima Pompeu.
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.
1. Leishmaniose. 2. Tolerância Imunológica.
3. Quimiocina. 4. Citocina. 5. Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa.
CDD 616.9364

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

A Leishmaniose é causada pela infecção com parasitas protozoários unicelulares do gênero *Leishmania*, atingindo humanos e outros vertebrados. O termo *Leishmania* foi assim nomeado em referência a W. B. Leishman, pesquisador que demonstrou o parasito corado, em 1901 (OMS, acesso em 26/04/2004).

É uma doença endêmica na maioria dos países tropicais e subtropicais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, acesso em 26/04/2004), está entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no mundo, e a segunda entre as causadas por protozoários, após a malária. Apesar das medidas adotadas nos programas de controle, a doença vem aumentando sua incidência, nos últimos anos, em várias regiões do mundo (OMS, acesso em 26/04/2004).

Estima-se que existem 12 milhões de pessoas no mundo com leishmaniose, algumas com manifestações clínicas e outras sem sintomas. Cerca de 1,5 a 2 milhões de novos casos ocorrem por ano, destes apenas 600.000 são oficialmente notificados (OMS, acesso em 26/04/2004).

A distribuição geográfica da leishmaniose é limitada pela espécie de flebótomo, sensibilidade do inseto ao clima frio, afinidade em se alimentar de sangue humano ou de animais e por sua capacidade de manter o desenvolvimento interno de espécies específicas de *Leishmanias* (OMS, acesso em 26/04/2004).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, acesso em 26/04/2004), os Estados brasileiros com maior índice de casos de leishmaniose são: Ceará, Maranhão, Pará, Bahia, Rondônia, Minas Gerais e Amazonas, sendo endêmica em 24 estados, com poucos casos no Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

No Brasil, nas lesões cutâneas do homem, foram isoladas espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*; *L. lindenbergi* e a espécie *L. amazonensis*, pertencente ao subgênero *Leishmania* (SILVEIRA e cols., 2004).

A leishmaniose é transmitida por diversas espécies de flebotomos (*Díptera, Psychodidae, Phlebotominae*) dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*. O inseto vetor é infectado com uma das espécies do protozoário flagelado pertencente ao gênero *Leishmania*. O ciclo evolutivo e a transmissão da *Leishmania* ocorrem em flebotomíneos e em hospedeiros vertebrados.

Cerca de 30 espécies de flebotomos podem ser infectados ao se alimentarem com o sangue de um hospedeiro reservatório infectado. Os hospedeiros são animais silvestres, tais como roedores, e animais domésticos, tais como cães e, possivelmente, gatos (SIMÕES-MATTOS e cols., 2004; SIMÕES-MATTOS e cols., 2004 *In press*). A maioria das leishmanioses é zoonótica (transmitidas de animais para humanos), as pessoas se infectam somente quando se expõem acidentalmente ao ciclo de transmissão natural. Entretanto, nas formas antroponóticas (transmitidas entre humanos através do inseto vetor), os humanos são o único reservatório hospedeiro (GRIMALDI e cols., 1991; GRIMALDI; McMAHAN-PRATT, 1991).

A infecção ocorre quando a fêmea do flebotomo pica o hospedeiro vertebrado e ingere, junto com o sangue, macrófagos parasitados pelas formas amastigotas de *Leishmania*, que são liberados no tubo digestivo do inseto. Após divisão binária, as amastigotas se transformam rapidamente em promastigotas, multiplicando-se no intestino do inseto. Ao picar outro animal susceptível, há inoculação das formas promastigotas, que são englobadas por macrófagos do hospedeiro. Nessas células, os parasitos se transformam em formas amastigotas, que se multiplicam por fissão binária dentro dos vacúolos parasitóforos. A célula infectada multiplica-se, dividindo seus parasitos entre as células filhas, ou se rompe liberando as amastigotas, que são fagocitadas por outros macrófagos, multiplicando-se mais uma vez. Havendo outro repasto, novo flebotomíneo ingere macrófagos infectados, e o ciclo recomeça (MOLYNEUX e cols., 1987; PEARSON; SOUSA, 1996).

A leishmaniose compreende um amplo espectro de síndromes clínicas que, dependendo da espécie do parasita, da virulência, da quantidade de parasita e da resposta imune do hospedeiro, pode ter resultados variáveis. As síndromes clínicas incluem lesões cutâneas simples que podem ou não ter cura espontânea, casos mais graves associados com disseminação para outros locais da pele ou

mucosa, como também visceralização dos parasitas levando à infecção que pode ser fatal se não tratada apropriadamente (AFONSO; SCOTT, 1993; JI e cols. 2002).

Nas Américas é denominada como leishmaniose tegumentar americana (LTA) e ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina.

A LTA manifesta-se sob quatro formas: 1) leishmaniose cutânea localizada (LCL); 2) leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM); 3) Leishmaniose cutânea disseminada (LD); 4) leishmaniose cutânea difusa (LCD).

1.1.1 Leishmaniose cutânea localizada (LCL):

É a forma mais comum, causa lesões na pele, podendo apresentar cura espontaneamente em poucos meses, ou pode ter curso longo e deixar cicatrizes desfigurantes (PEARSON e cols., 1999 e 2000). Trata-se de uma doença endêmica amplamente difundida em várias áreas do globo terrestre. A leishmaniose cutânea é provocada por várias espécies de *Leishmania*, adquirindo aspectos peculiares de acordo com o agente. A leishmaniose cutânea americana apresenta como agentes causadores: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) amazonensis* (PEARSON e cols., 2000; MELBY, 2002; SILVEIRA e cols., 2004). Ocasionalmente, *L. (L.) chagasi* causa leishmaniose cutânea simples (OLIVEIRA NETO e cols., 1986).

Pode se apresentar como lesão única ou múltipla, ulceradas, com bordas elevadas e necrose central nas áreas mais expostas do corpo (face, pescoço, membros). Em geral *L. (V.) braziliensis* causa lesões exudativas, grandes, têm fundo granuloso com bordas bem delimitadas e progredem rapidamente. Os pacientes apresentam sintomas sistêmicos como mal-estar, anorexia, perda de peso, e febre de baixa intensidade (PEARSON; SOUSA, 1996; PEARSON e cols., 1999, 2000).

1.1.2 Leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM):

Forma de leishmaniose causada principalmente pela *L. braziliensis*, encontrada na América Central e parte da América do Sul. (PEARSON; SOUSA, 1996). A doença se manifesta com úlceras na pele que se expandem, causando destruição maciça no tecido, especialmente no nariz e boca (BARRAL-NETTO e cols., 1997; PEARSON e cols., 2000).

1.1.3 Leishmaniose cutânea disseminada (LD):

Trata-se de uma condição rara (encontrada em 1% dos pacientes com leishmaniose cutânea), diferindo da leishmaniose cutânea difusa (anérgica) e da

leishmaniose cutânea americana clássica (COSTA e cols., 1986; CARVALHO e cols., 1994; VIEIRA e cols.,2002). Caracteriza-se pela presença de múltiplas (podendo atingir 200 a 400 lesões) lesões ulceradas ou não em várias partes do corpo. Apesar do grande número de lesões, o paciente com LD responde melhor e mais rápido ao tratamento que paciente com LCL. (VIEIRA e cols.,2002). *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* são os agentes causadores nos poucos pacientes que já apresentaram a doença, sendo que a maioria dos pacientes examinados por Carvalho e cols. (1994) foram infectados por *L. amazonensis*.

1.1.4 Leishmaniose cutâneo-difusa (LCD):

Causada pelas espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo “mexicana”. No Brasil, o agente etiológico é a *L. amazonensis* e, na Venezuela, a *L. pifanoi* (CARVALHO e cols.,1994). A doença começa como lesões nodulares localizadas ou em placas infiltradas que, aos poucos, disseminam-se pelo corpo, findando em nódulos isolados ou agrupados, máculas, pápulas, placas infiltradas ou até lesões verrucosas (COSTA e cols., 1995; BARRAL-NETTO e cols.,1997; BOMFIM e cols., 1996). Apresenta ainda uma anergia da resposta imune mediada por células (Intradermorreação de Montenegro negativa). Tem um curso lento, não tem cura e os pacientes podem apresentar remissões das lesões (PEARSON e cols., 2000).

1.2 Espécies de *Leishmania* de Maior Ocorrência no Brasil

Leishmania braziliensis:

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* está distribuída em todo o território nacional, sendo endêmica em vários países da América Central e América do Sul, e considerada a mais freqüente espécie causadora da leishmaniose cutânea no Brasil. Antes do surgimento da lesão na pele, as pessoas infectadas podem apresentar linfadenopatia regional, febre, e não muito freqüente hepatoesplenomegalia. Também pode causar leishmaniose mucosa nas pessoas já infectadas, manifestando-se por lesões na mucosa nasal, boca, faringe ou laringe, meses ou anos após a cura das lesões primárias (PEARSON; SOUSA,1996).

Leishmania (L) amazonensis:

A *Leishmania (L) amazonensis* pertence ao complexo *Leishmania mexicana*, pode causar várias manifestações clínicas, variando de lesões cutâneas simples ou múltiplas, nódulos deformantes e até comprometimento visceral. É o agente etiológico mais comum da leishmaniose cutânea difusa anérgica no Brasil, condição que está associada com diminuição da resposta imune celular específica (BARRAL e cols., 1986; JI e cols. 2002). Tem distribuição ampla, principalmente nas florestas tropicais da região amazônica. Ocorre no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Venezuela, Guiana Francesa e Suriname. No Brasil, tem sido encontrada também nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (PEARSON e cols.,2000).

1.3 A Resposta Imune

A diferenciação das células T CD4+ em células T auxiliares (Th)1 e Th2 baseia-se no perfil de citocinas obtido após estimulação antigênica. Em geral, as células Th1, produtoras de interferon (IFN)- γ e interleucina (IL)-2 estão associadas à resposta imune celular (ativação de macrófagos e hipersensibilidade retardada), enquanto que as células Th2, produtoras de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, estão associadas com a imunidade humoral.

A imunidade aos microrganismos está associada com o desenvolvimento predominante de Th1 ou Th2, sendo que esta predominância é que vai determinar o curso da infecção. Diversas abordagens têm sido utilizadas na tentativa de encontrar uma vacina contra leishmaniose, entretanto, até o momento, não se dispõe de uma vacina eficaz. Assim, a compreensão dos mecanismos pelos quais as células Th1 ou Th2 naturalmente se desenvolvem tornou-se importante na elaboração das vacinas e terapias para as doenças infecciosas e não-infecciosas.

Após o processo de infecção instalado, para que a resposta imune adaptativa ocorra, é necessário que o hospedeiro seja alertado da presença do microrganismo estranho. Na maioria das vezes, esta reação pode ser acompanhada pelos componentes da resposta imune inata (complemento, células *natural killer* (NK) e macrófagos) (SCHARTON-KERSTEN; SCOTT, 1995).

1.3.1 Citocinas e as Respostas Th1 e Th2

Citocinas são pequenas proteínas secretoras que regulam a imunidade, inflamação e hematopoiese. São produzidas durante as fases de ativação e efetora da imunidade inata e da imunidade específica servindo para mediar e regular as respostas imunes e inflamatórias (ABBAS e cols., 2000). Atuam através de receptores de superfície e geralmente induzem alterações na expressão gênica dentro da célula-alvo. Em geral, têm ação localizada, por um curto período, e em concentrações muito baixas.

Pressupõe-se que as citocinas precedem a expressão das quimiocinas, ou pelo menos estas retêm as quimiocinas nos linfonodos durante a infecção (ZAPH; SCOTT, 2003).

As citocinas presentes durante a estimulação antigênica têm sido um fator dominante na diferenciação das células T CD4+ in vitro e in vivo (SCHARTON-KERSTEN; SCOTT, 1995). São produzidas predominantemente pelas células T auxiliares (Th) e macrófagos, embora sejam também produzidas por endotélio, epitélio, fibroblasto e demais leucócitos (ABBAS e cols., 2000).

O indício de que a diferenciação Th1/Th2 explica a susceptibilidade e a resistência na leishmaniose veio a partir da infecção de camundongos com *Leishmania major*, estabelecendo um modelo murino para definição de fatores que contribuem para o desenvolvimento de células T CD4+ in vivo (SYPEK e cols., 1993; KEMP, 1997; JI e cols. 2002).

Como na espécie humana, a leishmaniose cutânea murina pode também ter resultados distintos, dependendo da linhagem de camundongo e da espécie do parasita. No modelo murino da leishmaniose cutânea, os animais podem ser classificados como resistentes ou susceptíveis à doença de acordo com o curso da doença.

Algumas linhagens de camundongos apresentam resistência à infecção e desenvolvem uma lesão pequena que, após um determinado período de tempo, cura, deixando poucos ou nenhum parasita no local da infecção. Outras linhagens murinas são muito susceptíveis, apresentam progressivo crescimento das lesões, levando-as eventualmente à morte devido à disseminação generalizada (AFONSO; SCOTT, 1993; CHAN, 1993; JI e cols. 2002).

As linhagens de camundongos C57BL/6 e C3H são geneticamente resistentes à infecção por *Leishmania* e capazes de apresentar uma resposta preferencialmente Th1. As células Th1 são produtoras de IFN- γ e IL-12 e estão geralmente associadas com resposta imune celular incluindo ativação do macrófago e hipersensibilidade retardada. Camundongo BALB/c, por outro lado, é uma linhagem altamente susceptível à infecção, apresentando uma forte resposta Th2 e desenvolvendo lesões crônicas que imitam as lesões apresentadas por pacientes com leishmaniose cutânea difusa. As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, e estão associadas com imunidade humoral, em particular resposta imune mediada por IgE. Camundongos BALB/c são mais susceptíveis a *L. amazonensis* e *L. mexicana* do que qualquer outra linhagem de camundongo, e têm sido utilizados em estudos sobre a produção inicial de citocina e quimiocina no desenvolvimento da infecção (SCHARTON-KERSTEN; SCOTT, 1995; MATTHEWS e cols., 2000; BOURREAU e cols., 2001 b; JI e cols. 2002).

Embora sejam esperadas respostas preferencialmente Th1 ou Th2, muitas vezes observa-se que algumas respostas podem envolver uma mistura dos dois tipos de células, especialmente em casos onde a resposta não é forte nem prolongada. Tanto fatores genéticos como ambientais atuam juntos na diferenciação Th1 ou Th2. (MOSMANN; COFFMAN, 1989; SCOTT, 1991; ROMAGNANI, 2000)

Células NK, da resposta inata, são importantes no período inicial, pois secretam IFN- γ , que tem papel relevante na diferenciação de células Th1, e também estimula a produção de proteína quimiotática de monócito (MCP-1/CCL2) pelos macrófagos, células dendríticas e pela própria célula NK (RITTER; KORNER, 2002). A produção de IFN- γ , nos primeiros dias de infecção, é essencial para a diferenciação de linfócitos Th0 em Th1 e para inibir diferenciação em Th2 (MOSMANN e COFFMAN, 1989). O IFN- γ , por sua vez, induz a produção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos (CAA) – Células dendríticas, macrófagos, monócitos, linfócitos B e por polimorfonucleados. A produção de IL-12 também pode ser desencadeada pela fagocitose do parasito, de produtos bacterianos ou por componentes da matriz extracelular (SUTERRWALA e cols., 1999) e amplificada pelo IFN- γ .

Portanto, a resposta imune tipo Th1 caracteriza-se pela secreção de IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- α (SCOTT, 1989; SCOTT, 1991; REINER;

LOCKSLEY, 1995). IFN- γ leva à ativação de mecanismos microbicidas do macrófago, através da síntese de óxido nítrico (MURRAY e cols., 1983; LIEW e cols., 1990 a), de radicais livres derivados do oxigênio e de enzimas lisossomiais. O TNF- α parece estar envolvido na indução da ativação de macrófagos, em sinergismo com IFN- γ e estimulando-o a produzir óxido nítrico (LIEW e cols., 1990 b; GREEN e cols., 1990; THEODOS e cols., 1991). Além disso, o TNF- α participa da modulação da resposta inflamatória, induzindo apoptose de células T no local da infecção.

O fenótipo Th2 é caracterizado pela alta produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e fator transformador do crescimento (TGF)- β (SCHARTON-KERSTEN; SCOTT, 1995; ROMAGNANI, 2000; JI e cols., 2002), embora as condições que o desencadeiam ainda não estejam bem definidas. Himmelrich e cols. (1998), observaram um aumento de RNA-m de IL-4 após 16 horas de infecção em linfonodos drenantes de animais susceptíveis, e que retornavam aos níveis basais após 48 horas, voltando a elevar-se a partir do 5º dia de infecção, permanecendo alto no decorrer da doença. Nas primeiras horas de infecção, várias células podem participar da produção de IL-4, como os neutrófilos e células T CD4+ NK1+ (BRANDT e cols.,2000; NOBEM-TRAUTH e cols., 2000; ROMAGNANI, 2000), modulando a resposta para diferenciação tipo Th2.

A possibilidade de detectar a ocorrência de resposta tipo Th1 ou Th2 em condições normais ou patológicas está limitada a alguns problemas metodológicos. A maioria das citocinas é produzida pelas células T em pequenas quantidades e algumas delas não são liberadas no microambiente, mas transmitidas diretamente de uma célula a outra. Devido à dificuldade de medir ou detectar a maioria das citocinas espontaneamente secretadas em fluidos biológicos ou nos sobrenadantes de suspensões celulares, tem-se utilizado os marcadores de superfície que mostram expressão preferencial para células Th1 ou Th2. Sabe-se que as moléculas mais associadas tanto *in vivo* quanto *in vitro* para Th1 são CCR5 e CCR7 e para TH2 são CCR3, CCR4 e CCR8 (BONECCHI e cols.,1998; SALLUSTO e cols., 1998 a e b; RANDOLPH e cols.,1999). Estas moléculas são os receptores de quimiocinas e representam um papel importante na diferenciação Th1 ou Th2.

1.3.2 Quimiocinas e as Respostas Th1 e Th2

A secreção de quimiocinas tem sido detectada em várias doenças, auxiliando as células da resposta imune inata e específica a controlarem a proliferação de patógenos, atuando no controle de infecções.

As quimiocinas são pequenas proteínas, com tamanho aproximado de 8 a 14 kDA, fazem parte da grande família das citocinas, e são produzidas pelas células em resposta à lesão tecidual ou à infecção (SCAPINI e cols., 2000; RITTER; KORNER, 2002). Algumas quimiocinas são importantes no controle dos processos inflamatórios, enquanto outras estão envolvidas no tráfico de leucócitos entre os órgãos linfóides primários e secundários (NELSON; KRENSKY, 2001).

Estruturalmente, a família das quimiocinas é caracterizada pela presença de quatro resíduos de cisteína na porção amino terminal (NH₂) da molécula, ligados por pontes de sulfeto, e subdivididas em quatro famílias, de acordo com o arranjo das primeiras cisteínas na seqüência de aminoácidos: C, CC, CXC e CX₃C. Quando as duas primeiras cisteínas são adjacentes uma da outra, elas são classificadas na família CC. A família CXC possui um aminoácido entre as duas cisteínas iniciais. A família C é constituída por apenas um par de cisteína, e a família CX₃C contém três aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas (CHRISTOPHERSON II; HROMAS, 2001; RITTER; KORNER, 2002).

Até o momento, foram identificadas cerca de 44 quimiocinas nos seres humanos (MURPHY e cols., 2000; ROSSI; ZLOTNIK, 2000; NELSON; KRENSKY, 2001) (Tabelas 1,2,3,4). Dependendo da função patofisiológica, é possível distinguir entre quimiocinas inflamatórias e homeostáticas. As primeiras são produzidas na maioria dos tecidos sob condições patológicas, sendo estimuladas por citocinas e toxinas bacterianas, enquanto que as últimas são expressas “constitutivamente” (MURPHY e cols., 2000; ZLOTINIK; YOSHIE, 2000; NELSON; KRENSKY, 2001).

Todas as quimiocinas exercem sua função biológica através de receptores presentes nas superfícies das células alvos, que atravessam sete vezes a membrana celular, com a porção intracelular acoplada à proteína G (MURDOCH; FINN, 2000; ZLOTINIK; YOSHIE, 2000; NELSON; KRENSKY, 2001). Os receptores de quimiocinas também formam duas subfamílias: CXCRs e CCRs. Foram identificados cerca de 16 receptores (Tabelas 2 e 4).

Constatou-se que há redundância e multiplicidade nas ligações entre as quimiocinas e os receptores, devido ao envolvimento de interações de alta afinidade. Desse modo, uma única quimiocina pode se ligar a vários receptores, enquanto que um único receptor pode sinalizar para várias quimiocinas. Para Albert Zlotnik e Osamu Yoshie (2000), esta é uma característica interessante das quimiocinas, pois reflete sua capacidade em regular diferentes subpopulações de leucócitos, especialmente em relação às respostas inflamatórias agudas ou crônicas. Ainda segundo esses autores, a redundância não é uma regra na família das quimiocinas, pois algumas exibem alta especificidade quanto ao tecido e ao receptor.

Os receptores de quimiocinas são expressos por diferentes tipos de leucócitos, sendo que alguns receptores restringem-se a um determinado tipo de célula. Por exemplo, CXCR1 é predominantemente expresso por neutrófilos, enquanto que outros receptores são expressos por mais de um tipo de célula. CCR2 pode ser expresso por monócitos, células T, células NK, células dendríticas e basófilos. Além disso, os receptores de quimiocinas são constitutivamente expressos em algumas células, enquanto em outras são induzidos, como é o caso de CCR1 e CCR2, que são expressos constitutivamente por monócitos e, quando estimulados por IL-2, são expressos em linfócitos (ROLLINS, 1997).

Há evidências de que as quimiocinas podem influenciar a diferenciação da célula T. Muitas quimiocinas atuam como agentes proinflamatórios, freqüentemente associadas com a expressão de citocinas tipo Th1 (IFN γ , IL-2, IL-12) e ativação de macrófagos. Entretanto, algumas quimiocinas são especificamente induzidas por citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) em monócitos ou outras células. Assim, a produção de algumas quimiocinas está associada com respostas Th1 (proinflamatórias), e outras estão associadas com respostas Th2, ficando a expressão do fenótipo dependente da natureza do desenvolvimento das respostas imunes. Embora ainda não se tenha uma definição sobre quais quimiocinas estão associadas às respostas Th1 e Th2, a associação dos receptores de quimiocinas aos fenótipos Th1 e Th2 já está bem definida. CCR1, CCR2, CCR5, CXCR3 levam a uma resposta Th1, enquanto CCR3, CCR4, CCR10, CXCR1, CXCR2 levam a uma resposta TH2 (MURPHY e cols., 2000; ROSSI; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000; WONG; FISH, 2003).

Cogita-se que as células Th1 produzam mais quimiocinas que as células Th2, e que a produção de algumas quimiocinas seja induzida pelas citocinas Th2 (IL-4 ou IL-10) (ROSSI; ZLOTNIK, 2000), sugerindo-se que as quimiocinas devem ter mais influência sobre o controle das respostas Th1/Th2 do que normalmente se conhece. Atualmente, o estudo das quimiocinas abrange aplicações amplas em varias áreas. O fato de seus receptores estarem acoplados à proteína G favorece-os a desempenhar papel importante como moléculas inibidoras com forte potencial terapêutico (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000).

Estudos publicados na última década têm mostrado a participação das quimiocinas no sistema de tráfego celular, visto que a síntese desses mediadores inflamatórios é um mecanismo fundamental para o processo dinâmico do recrutamento de leucócitos até o local da inflamação. A função das quimiocinas não está restrita à quimiotaxia, pois estão envolvidas na maturação de células dendríticas, ativação de macrófagos, degranulação dos neutrófilos, síntese de anticorpos e ativação da célula T. Esta afirmação contribui para o fato de que as quimiocinas influenciam tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (WONG; FISH, 2003).

A sensibilização in vitro parece ser um método alternativo importante para o estudo das interações iniciais na infecção humana por *Leishmania*. No entanto, ainda não foi demonstrado se ela reproduz a resposta imune observada na sensibilização humana in vivo.

Como não é possível estudar os eventos iniciais da leishmaniose humana, devido a restrições éticas, sistemas in vitro, que reproduzem estes momentos, podem contribuir para compreender a patogênese da doença humana e orientar estratégias para elaboração de vacinas, além de importantes informações para elucidação do vasto espectro de resposta imune observada na leishmaniose humana.

TABELA 1 – Quimiocinas da família C, seus receptores e células que expressam o receptor.

Antiga nomenclatura	Nova nomenclatura	Receptor	Células que expressam o receptor
Linfotactina/ATAC	XCL1	XCR1	Célula T
SCM-1β	XCL2	XCR1	Célula T

Fonte: NELSON; KRENSKY, 2001; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000

TABELA 2 – Quimiocinas da família CXC, seus receptores e células que expressam o receptor.

Antiga nomenclatura	Nova nomenclatura	Receptor	Células que expressam o receptor
GRO α /MGSA- α	CXCL1	CXCR2	Neutrófilo, monócito, eosinófilo, endotélio
GRO β /MGSA- β	CXCL2	CXCR2	Neutrófilo, monócito, eosinófilo, endotélio
GRO γ /MGSA- γ	CXCL3	CXCR2	Neutrófilo, monócito, eosinófilo, endotélio
PF4	CXCL4	desconhecido	
ENA-78	CXCL5	CXCR2	Neutrófilo, monócito, eosinófilo, endotélio
GCP-2	CXCL6	CXCR1 CXCR2	Neutrófilo, monócito, astrócito, endotélio
NAP-2	CXCL7	CXCR2	Neutrófilo, monócito, eosinófilo, endotélio
IL-8	CXCL8	CXCR1 CXCR2	Neutrófilo, monócito, eosinófilo, endotélio
Mig	CXCL9	CXCR3	Célula T Th1, célula B, célula mesangial, célula músculo liso
IP-10	CXCL10	CXCR3	Célula T Th1, célula B, célula mesangial, célula músculo liso
I-TAC	CXCL11	CXCR3	Célula T Th1, célula B, célula mesangial, célula músculo liso
SDF-1 α/β	CXCL12	CXCR4	Célula T, célula dendrítica (imatura, madura), monócito, célula B, neutrófilo, plaquetas, astrócito
BLC/BCA-1	CXCL13	CXCR5	Célula T, células B, astrócito
BRACK//bolekine	CXCL14	Desconhecido	

Fonte: NELSON; KRENSKY, 2001; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000

TABELA 3 – Quimiocinas da família CX3, seus receptores e células que expressam o receptor.

Antiga nomenclatura	Nova nomenclatura	Receptor	Células que expressam o receptor
Fractalquina	CX3CL1	CX3CR1	Monócito, macrófago, célula natural killer

Fonte: NELSON; KRENSKY, 2001; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000

TABELA 4 – Quimiocinas da família CC, seus receptores e células que expressam o receptor.

Antiga nomenclatura	Nova nomenclatura	Receptor	Células que expressam o receptor
I-309	CCL1	CCR8	Monócito, célula B, célula T, timócito
MCP-1	CCL2	CCR2	Monócito, célula dendrítica (imatura), basófilo, célula T, célula natural killer, célula endotelial, fibroblasto
MIP-1 α	CCL3	CCR1 CCR5	Monócito, célula dendrítica (imatura), célula T, neutrófilo, esinófilo, célula mesangial, plaquetas
MIP-1 β	CCL4	CCR5	Célula T Th1, célula dendrítica (imatura, madura), monócito, célula natural killer, timócito
RANTES	CCL5	CCR1 CCR3 CCR5	Célula T Th1, célula dendrítica (imatura, madura), monócito, célula natural killer, timócito
MCP-3	CCL7	CCR1 CCR2 CCR3	Eosinófilo, monócito, célula dendrítica, célula T, macrófago, célula B
MCP-2	CCL8	CCR3	Eosinófilo, basófilo, célula T Th2, célula dendrítica, plaquetas
Eotaxina	CCL11	CCR3	Eosinófilo, basófilo, célula T Th2, célula dendrítica, plaquetas
MCP-4	CCL13	CCR2 CCR3	Célula B, monócito, macrófago, célula dendrítica, eosinófilo, célula B, célula Th2
HCC-1	CCL14	CCR1	Monócito, célula dendrítica (imatura), célula T, neutrófilo, eosinófilo, célula mesangial, plaquetas
HCC-2/Lkn-1/MIP-1 δ	CCL15	CCR1 CCR3	Eosinófilo, monócito, macrófago, célula dendrítica, célula T Th2
HCC-4/LEC	CCL16	CCR1	Eosinófilo, monócito, macrófago, célula dendrítica
TARC	CCL17	CCR4	Célula dendrítica (imatura), célula T Th2, célula natural killer, timócito
DC-CK1/PARC	CCL18	Desconhecido	
MIP-3 β /ELC/Exodus-3	CCL19	CCR7	Célula dendrítica (madura), célula T, célula B, célula natural killer, timócito
MIP-3 α /LARC/Exodus-1	CCL20	CCR6	Célula dendrítica (imatura), célula T, célula B
6Ckine/SLC/Exodus-2	CCL21	CCR7	Célula dendrítica (madura), célula T, célula B, célula natural killer, timócito
MDC	CCL22	CCR4	Célula dendrítica (imatura), célula T Th2, célula natural killer, timócito
MPIF-1	CCL23	CCR1	Monócito, célula dendrítica (imatura), célula T, neutrófilo, eosinófilo, célula mesangial, plaquetas
MPIF-2/Eotaxina-2	CCL24	CCR3	Eosinófilo, basófilo, célula T Th2, célula dendrítica, plaquetas
TECK	CCL25	CCR9	Célula T, timócito
Eotaxina-3	CCL26	CCR3	Eosinófilo, basófilo, célula T Th2, célula dendrítica, plaquetas
CTACK/ILC	CCL27	CCR10	Célula T, melanócito, fibroblasto, células de Langerhans

Fonte: NELSON; KRENSKY, 2001; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o papel de citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas no mecanismo de supressão da produção de IFN γ de células mononucleadas do sangue periférico de indivíduos sadios estimuladas por *Leishmania amazonensis*, na infecção humana in vitro.

2.2 Específicos

- Avaliar o perfil e a cinética da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas pelas CMSP de indivíduos sadios estimuladas in vitro com *Leishmania amazonensis*, que respondem com alta ou baixa concentração de IFN γ ;
- Avaliar a o perfil e a cinética de citocinas pelas CMSP de indivíduos sadios estimuladas in vitro com *Leishmania amazonensis*, que respondem com alta ou baixa concentração de IFN γ .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura do Parasito e Preparo do Antígeno

Foi utilizado *Leishmania amazonensis*, (MHOM/BR/88/Ba125), caracterizada por isoenzimas e anticorpos monoclonais (ALMEIDA, 2003).

Para estimulação in vitro das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) foram utilizadas promastigotas vivas de fase estacionária de crescimento, cultivadas em meio Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco BRL), 2% de urina estéril e 50 µg/mL de Gentamicina (Gibco BRL).

As promastigotas estacionárias foram lavadas três vezes com salina estéril gelada, centrifugadas a 3.000 rpm, por 15 minutos a 4°C e ressuspensas em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich) na concentração de 5×10^6 /mL. A viabilidade da *Leishmania amazonensis* era analisada pela motilidade.

3.2 Isolamento das Células Mononucleadas do Sangue Periférico (CMSP)

As células mononucleadas foram obtidas a partir do creme leucocitário de 14 indivíduos sadios, cedidos pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará (HEMOCE). Foram incluídos somente creme leucocitário de indivíduos que apresentaram sorologia negativa para doença de Chagas e HIV, além de linfoproliferação negativa quando estimulados com antígenos de *Leishmania*.

As CMSP foram separadas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich) a 1.500 rpm por 30 minutos a 21°C. A camada de células mononucleadas foi coletada, lavada três vezes em salina estéril, ressuspensa em 5 mL de meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich) suplementado com 10mM de HEPES (Sigma Aldrich), 50 µg/mL de gentamicina (Gibco BRL), 100 U/mL de penicilina (Sigma Aldrich), 200 µg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich), 2mM de glutamina (Sigma Aldrich) e 10 % de soro AB humano inativado. Após contagem das células e ajuste da concentração, elas foram semeadas em placa de 24 poços

(Nunc, Roskilde, Denmark). Cada poço continha 5×10^6 células em 1 mL, cultivadas por 5 dias, com ou sem promastigotas de *Leishmania amazonensis*, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ e 95% de ar.

3.3 Ensaio de Linfoproliferação

A estimulação foi feita com células mononucleadas do sangue periférico (CMSP), cultivadas em triplicatas e estimuladas com promastigotas vivas na concentração de 2×10^6 /mL, ou com 20 µg/mL de Concanavalina A (Sigma Aldrich), ou sem estímulo, em placa de 96 poços com fundo chato (Costar Corning Inc. Actom.MA). As células foram cultivadas por 5 dias em incubadora úmida (5% CO₂, 37°C). No quinto dia de cultivo, foi adicionado 0,2 µCi de Timidina-H³/poço e incubada por um pernoite. Posteriormente, as células foram coletadas com Cell Harvester (Cambridge Technology INC) e, após secagem, os discos de filtro foram removidos, transferidos para tubos e adicionado o fluido cintilante. A leitura foi realizada no contador de cintilação líquida Beckmann LS 6000.

Foram considerados positivos resultados com índice de proliferação ≥ 5 .

3.4 Coleta das Amostras

Após o cultivo, os sobrenadantes das culturas foram coletados nos tempos 12 horas, 48 horas e 120 horas em tubos eppendorff e centrifugados em microcentrífuga, a 6.000 rpm por 1 minuto. Em seguida, foram separados, distribuídos em alíquotas e mantidos a -70°C para posterior determinação de citocinas.

Nos sedimentos das células, foram adicionados 200 µL de TRIZOL (GIBCO BRL), os tubos foram vortexados e mantidos a -70°C para análise das quimiocinas.

3.5 Extração de RNAm e Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído da cultura de células utilizando TRIZOL (GIBCO BRL), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, após a obtenção do sobrenadante, o RNAm com isopropanol foi lavado com etanol 70% e após um pernoite, lavado com etanol 100%, a seguir solubilizado em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A pureza e a quantificação do RNA foram medidas a A_{260} e A_{280} no aparelho Thermo Spectronic (BIONATE 3), sendo as amostras estocadas a -70°C . Para a síntese de cDNA foram utilizados 2 μg do RNA, volume total de 23 μL , contendo 1 μL de Oligo (dT) *primer* (PROMEGA) na concentração 50 mM, 5 μL do tampão (MMLV-PROMEGA), 200 U/ μL de transcriptase reversa (PROMEGA) e 5 μL de deoxinucleotídeo-trifosfato (dNTP) (2,5 mM- Invitrogen Life Technologies, São Paulo, SP), e a solução foi incubada a 4°C por 60 minutos, depois foram adicionados 175 μL de água Milli-Q e as amostras estocadas a -20°C .

3.6 Detecção de RNAm para Quimiocinas e Receptores de Quimiocinas

As quimiocinas MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), IP-10 (CXCL10), MIG (CXCL9), RANTES (CCL5), IL-8 (CXCL8) e I-309 (CCL1), os receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR4, CCR5 e CXCR3 e β -actina tiveram seus c-DNAs analisados pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). As seqüências dos *primers* e os tamanhos estão sumarizados nos itens 3.7 e 3.8 a seguir. Os *primers* para quimiocinas, receptores de quimiocinas e β -actina foram obtidos da Invitrogen Life Technologies-São Paulo, SP.

Cinco microlitros da solução c-DNA foram utilizados como *template* em uma mistura contendo *primers* específicos, 2,5mM de deoxinucleotídeo-trifosfato (dNTP), 25 mM de MgCl_2 , e 5U de Taq Polimerase (Promega) e os PCRs realizados no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA/EUA).

3.7 Sequências de *Primers* e Tamanhos das Quimiocinas

MCP-1/CCL2	Sence: AGG AAG ATC TCA GTG CAG AGG Antisense: AGT CTT CGG AGT TTG GGT TTG	177 pb
MIP-1 α /CCL3	Sence: ACC ATG GCT CTC TGC AAC CA Antisense: TTA AGA AGA GTC CCA CAG TG	391 pb
MIP-1 β /CCL4	Sence: CCT GCT GCT TTT CTT CAC CC Antisense: CAC CTA ATA CAA TAA CAC GGC	336 pb
RANTES/CCL5	Sence: TCA TTG CTA CTG CCC TCT GC Antisense: CGT CGT GGT CAG AAT CTG GG	373 pb
IL-8/CXCL8	Sence: CTT GGC AGC CTT CCT GAT TT Antisense: CTC AGC CCT CTT CAA AAA CT	266 pb
MIG/CXCL9	Sence: CCA GTG CAC CTG TCA TAT GCT CT Antisense: CCA ACA TGG AGT AGC CAG GAA A	433 pb
IP-10/CXCL10	Sence: CCT GCT TCA AAT ATT TCC CT Antisense: CCT TCC TGT ATG TGT TTG GA	229 pb
I-309/CCL1	Sence: CAG TGG TGA GCT CTT AGC TT Antisense: AGG GCA GAA GGA ATG GTG TA	449 pb
B-ACTINA	Sence: ATG TTT GAG ACC TTC AAC AC Antisense: CAC GTC ACA CTT CAT GAT GG	495 pb

3.8 Sequências de *Primers* e Tamanhos dos Receptores de Quimiocinas

CCR1	Sence: CCT TCT GGA TCG ACT ACA AGT T Antisense: GTA GCA GAT GAT CAT GAC CAA C	396 pb
CCR2	Sence: GTA GGA TTG CCC CAC TCC AAA Antisense: TAC TGT TTT CCA ACC CAG CTG G	302 pb
CCR4	Sence: GGA TAT AGC AGA TAC CAC CCT C Antisense: AAA TCA TCT TGC ACA GAC CTA G	329 pb
CCR5	Sence: GGC TGT GAG GCT TAT CTT CAC C Antisense: CGT GTC ACA AGC CCA CAG ATA T	368 pb
CXCR3	Sence: TAG AAG TTG ATG TTG AAG AGG G Antisense: CAG CTC TTC CTA TGA CTA TGG A	339 pb

A reação foi realizada em 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C, e 2 minutos a 72°C, com um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C. O produto do PCR foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e revelado com nitrato de prata 0,2%. Os tamanhos dos produtos da PCR foram quantificados comparando-os com um marcador (100 pares de base) colocado no mesmo gel. A intensidade da banda dos produtos amplificados foi analisada utilizando o programa EagleSight[®], versão 3.2 para Windows (Stratagene, La Jolla, CA/EUA). Os resultados foram expressos como a razão entre a expressão de quimiocina ou receptor de quimiocina e a expressão de β -actina.

O resultado foi considerado como a diferença entre o índice da amostra estimulada com o antígeno *L. amazonensis* e o índice da amostra não estimulada.

3.9 Quantificação das Citocinas

As determinações das concentrações de IFN γ , IL-10, IL-12 e IL-13, presentes nos sobrenadantes das culturas de CMSP estimuladas com *Leishmania amazonensis*, foram feitas através de ensaio ELISA, conforme as instruções do fabricante (PharMingen). Brevemente, a placa (Costar Corning Inc. Actom.MA) foi sensibilizada com o anticorpo de captura anticitocina purificado nas concentrações determinadas para cada citocina, por um pernoite a 4°C. O bloqueio foi feito com SBF 10% e soroalbumina bovina (BSA) 1% em salina tamponada com fosfato (STF), e a placa incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem com STF–Tween 20 (0,05%), foram adicionados os padrões e amostras, e a placa foi incubada por toda a noite a 4°C. Após outra lavagem com STF–Tween 20, o anticorpo de detecção anticitocina biotilado foi adicionado e a placa incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Depois de lavada, a placa foi incubada com peroxidase de cavalo conjugada a avidina (PharMingen) por 30 minutos à temperatura ambiente. A placa foi então lavada e adicionada a solução do substrato 3,3',5,5'- tetrametil benzidina(TMB) (Sigma Aldrich). A reação foi finalizada com ácido fosfórico. A leitura foi realizada no leitor de ELISA (Devices Corp., Sunnyvale, CA.), filtro 450 nm e análise dos resultados feita pelo programa Softmax PRO (Molecular Devices Corp.).

O resultado das citocinas foi considerado como a diferença entre os valores das amostras estimuladas com antígeno *L. amazonensis* e as amostras não estimuladas.

3.10 Análise Estatística

As análises dos grupos foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney, do programa GraphPad Prism, versão 3.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA.). Foram consideradas significantes quando o valor de p era igual ou menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Produção de IFN γ como Critério de Divisão dos Grupos

Verificou-se que a produção de IFN γ , em resposta à *L. amazonensis*, foi muito ampla, variando de 10,0 a 583,66 pg/ml, com 120h de infecção. Como critério da divisão dos grupos, adotou-se o mesmo utilizado por POMPEU e cols. (2001), que usaram a mediana para separar os grupos em alto e baixo respondedor. Indivíduo com produção superior a 145,8 pg/mL foram classificados como Alto Respondedor (AR) e aquele com produção inferior, Baixo Respondedor (BR) (Figura 1; Apêndice 1).

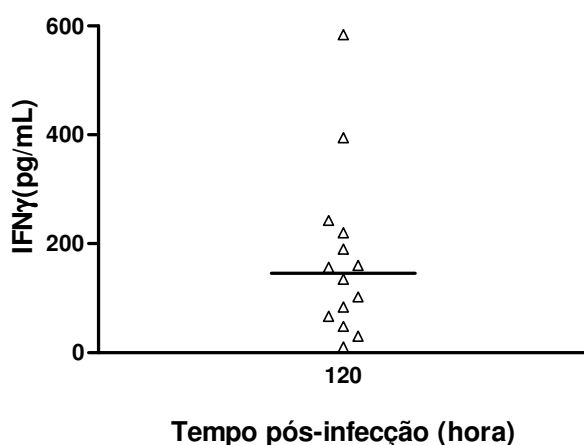


FIGURA 1 – Produção de IFN γ nos sobrenadantes das CMSP infectadas por *L. amazonensis* em 120 horas pós-infecção nos grupos Alto Respondedor (AR) e Baixo Respondedor (BR). A barra indica a mediana. Classificação em AR (> 145 pg/mL) e BR (< 145 pg/mL) em relação à resposta ao IFN γ . Valores obtidos pela determinação da mediana. A concentração de IFN γ foi medida por ELISA.

4.2 Análise da Expressão de Quimiocinas

Foi avaliada a produção de RNAm das quimiocinas I-309/CCL1, MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9, IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 de CMSP, de 14 indivíduos saudáveis, estimuladas com promastigotas vivas de *Leishmania amazonensis* após 12 horas, 48 horas e 120 horas de infecção.

MIP-1 α (CCL3) – Foi observada produção de MIP-1 α /CCL3 no grupo AR já nas primeiras horas de infecção (Figura 2A; Apêndice 2), decrescendo até níveis indetectáveis (4,8 vezes menor que a produção inicial) com 120h, enquanto que os BR não expressaram esta quimiocina durante todo o período observado. Quando se compara a resposta dos dois grupos, verifica-se que houve diferença estatisticamente significativa na concentração de MIP-1 α /CCL3 com 12 horas ($p=0,053$) e 48 horas ($p=0,053$) pós-infecção.

RANTES (CCL5) – Verificou-se expressão importante desta quimiocina no grupo AR, em todo o período avaliado, sendo mais intensa nas primeiras 48h de infecção (Figura 2B; Apêndice 3). Chamou atenção o fato de ela não ser expressa pelo grupo BR. A diferença na síntese de RANTES/CCL5 entre os dois grupos variou até 4 vezes, sendo estatisticamente significativa em 12 horas ($p=0,026$) e 48 horas ($p=0,011$) pós-infecção.

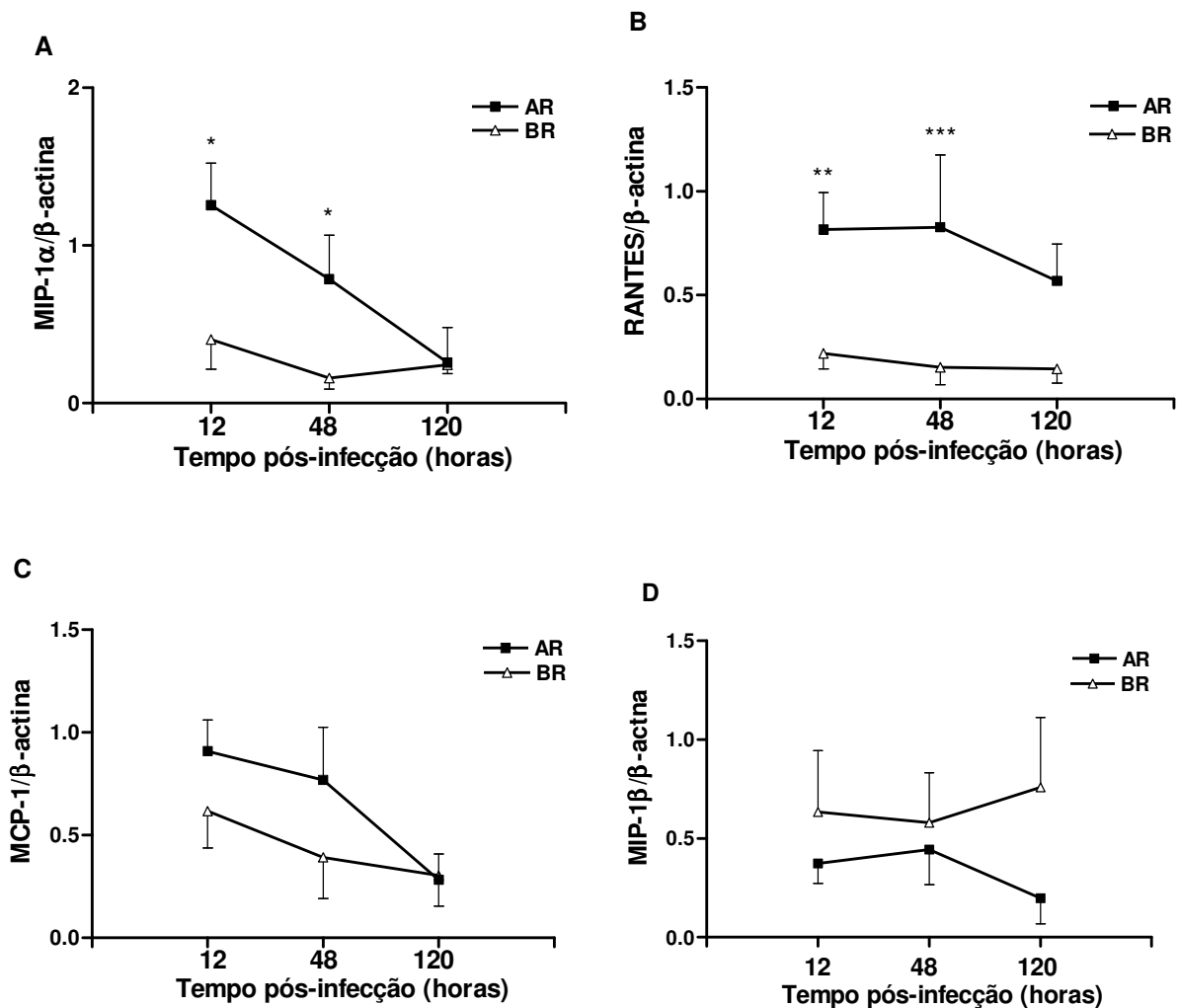


FIGURA 2 – Análise semiquantitativa da expressão de RNAm das quimiocinas MIP-1α/CCL3 (A), RANTES/CCL5 (B), MCP-1/CCL2 (C) e MIP-1β/CCL4 (D) através de RT-PCR de CMSP de 14 indivíduos sadios estimuladas com *L. amazonensis*. Cada ponto representa a média ± EP da razão entre a expressão de quimiocina e a expressão de β-actina após 12h, 48h e 120h de infecção. Asterisco indica as diferenças estatísticas significantes entre os grupos. (*) p=0,053; () p=0,026; (***) p=0,011. AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor.**

MCP-1 (CCL2) – Foi produzida pelos dois grupos, sendo que no grupo AR a expressão foi maior, variando de 1,5 a 2 vezes a mais que a do BR (Figura 2C; Apêndice 4). Em ambos os grupos, a expressão de MCP-1/CCL2 caiu a níveis não detectáveis com 120 horas. Nos indivíduos AR, no tempo de 120 horas, houve uma redução de 3 vezes da expressão inicial, enquanto que no BR a redução foi de 2 vezes, no entanto, quando se comparou a resposta dos dois grupos não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

MIP-1 β (CCL4) – Em relação à MIP-1 β /CCL4, verificou-se que houve baixa expressão pelo grupo AR, e após 48 horas de infecção houve inibição de sua expressão cerca de 2,2 vezes menor que a inicial, ficando praticamente indetectável, com 120 horas de infecção (Figura 2D; Apêndice 5). Quanto ao grupo BR, este praticamente manteve a mesma expressão em todos os tempos de infecção, sendo sempre maior que a do grupo AR, variando de 1,4 vezes no início a 3,8 vezes em 120 horas de infecção. Embora a expressão de MIP-1 β /CCL4 tenha sido maior no grupo BR que no grupo AR, a diferença não foi estatisticamente significativa.

IP-10 (CXCL10) – Verificou-se que houve expressão diferente da quimiocina IP-10/CXCL10 nos dois grupos. O grupo AR expressou IP-10/CXCL10 em alta concentração já com 12 horas de infecção, ocorrendo redução a partir daí (Figura 3A; Apêndice 6). O grupo BR apresentou uma baixa expressão 12 horas de infecção, com elevação crescente até o tempo de 120 horas de infecção, ocorrendo um aumento de 3,8 vezes em relação ao tempo inicial. A expressão entre os dois grupos foi estatisticamente significativa em 12 horas de infecção ($p=0,026$).

MIG (CXCL9) – Observou-se um comportamento diferente entre os dois grupos, em relação à expressão de MIG/CXCL9 (Figura 3B; Apêndice 7). Enquanto o grupo AR apresentou síntese tardia (120 horas de infecção), no grupo BR verificou-se grande expressão desta quimiocina, já com 12 horas de infecção, sendo a diferença entre os dois grupos de 8 vezes e estatisticamente significativa ($p=0,026$). A produção de MIG/CXCL9 foi superior no grupo BR, em relação ao AR, em todos os momentos analisados.

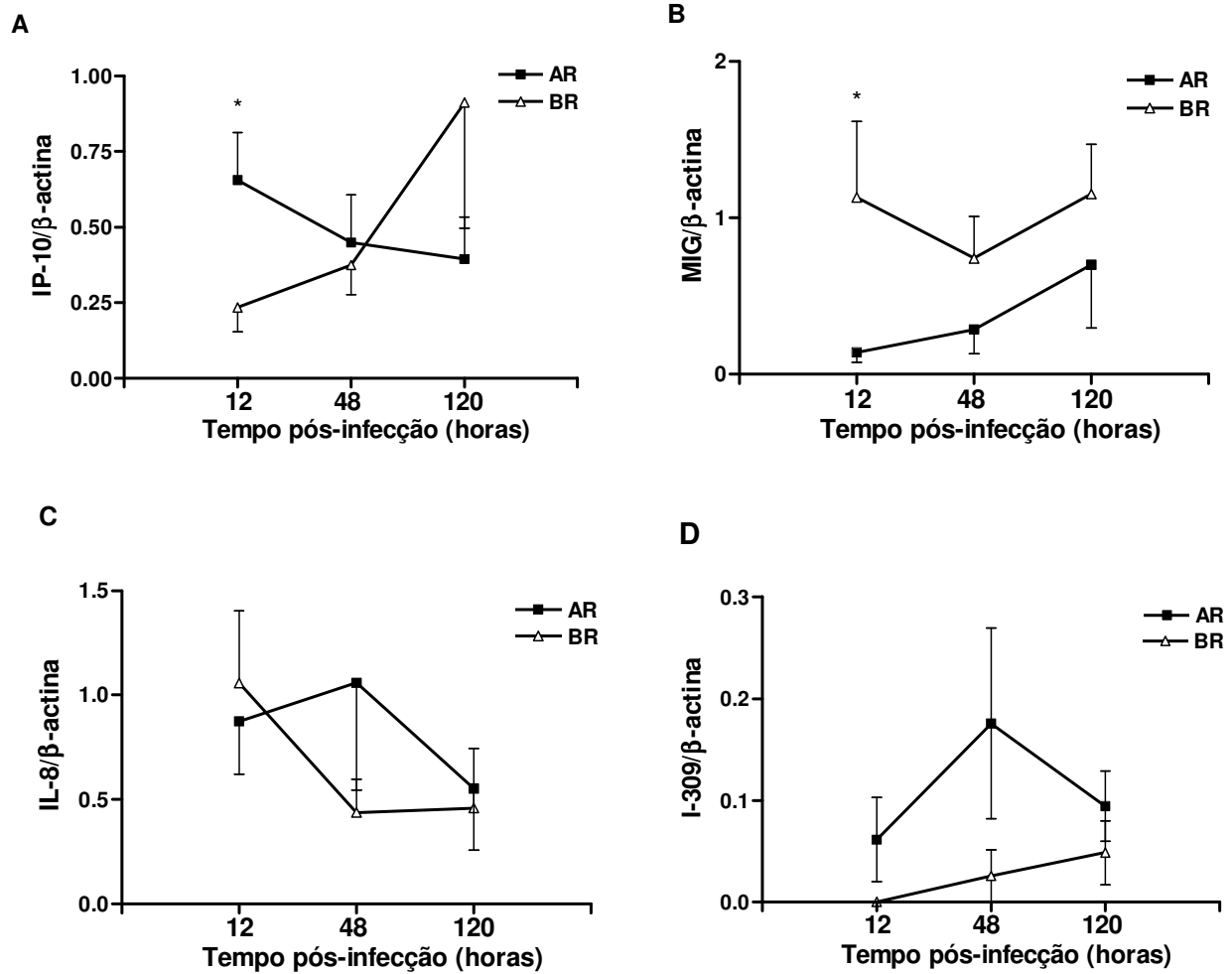


FIGURA 3 – Análise semiquantitativa da expressão de RNAm das quimiocinas IP-10/CXCL10 (A), MIG/CXCL9 (B), IL-8/CXCL8 (C) e I-309/CCL1 (D) através de RT-PCR de CMSP de 14 indivíduos sadios estimuladas com *L. amazonensis*. Cada ponto representa a média \pm EP da razão entre a expressão de quimiocina e a expressão de β -actina após 12h, 48h e 120h de infecção. Asterisco indica as diferenças estatísticas significantes entre os grupos. (*) $p=0,026$. AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor.

IL-8 (CXCL8) – Ambos os grupos iniciaram a resposta com franca síntese de RNAm de IL-8/CXCL8 (Figura 3C; Apêndice 8), no entanto, com 48 horas de infecção, observou-se uma acentuada redução no grupo BR, atingindo concentração de 2,4 vezes menor que a do AR. A expressão de IL-8 no grupo AR manteve-se alta até 48 horas, reduzindo-se a partir daí. Com 120 horas de infecção, ambos os grupos apresentavam as mesmas concentrações. Embora a diferença entre os dois grupos tenha sido grande, em 48 horas de infecção, ela não foi estatisticamente significativa.

I-309 (CCL1) – Praticamente não houve expressão desta quimiocina no grupo BR, ao longo do período observado (Figura 3D; Apêndice 9). O grupo AR apresentou baixa produção de I-309/CCL1 no tempo inicial, elevando esta produção até 48 horas de infecção e atingindo uma concentração de 3,5 vezes mais elevada que a do BR. Após esse período houve diminuição da expressão até valores semelhantes ao obtido no tempo inicial. Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos.

4.3 Análise da Expressão de Receptores de Quimiocinas

Foi feita a análise dos seguintes receptores de quimiocinas: CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR3 de CMSP, de indivíduos sadios, estimuladas com promastigotas de *L. amazonensis* com 12 horas, 48 horas e 120 horas de infecção.

CCR1 – Ocorreu expressão moderada de CCR1 no grupo BR já com 12 horas de infecção, após este tempo ela diminuiu até 48 horas de infecção (2,2 vezes menos que o tempo inicial) e manteve-se nestes níveis até 120 horas de infecção (Figura 4A; Apêndice 10). A expressão desse receptor no grupo AR foi um pouco mais baixa que a do grupo BR e foi mantida nesses valores até o final da avaliação. A diferença inicial, em 12 horas de infecção, entre os dois foi aproximadamente de 2 vezes, embora não tenha sido estatisticamente significativa.

CCR2 – Verificou-se moderada expressão do receptor CCR2 no grupo BR, ao longo do tempo avaliado (Figura 4B; Apêndice 11). Já no grupo AR, sua expressão foi cerca de 2 vezes mais elevada que a do BR, no tempo inicial, ocorrendo uma inibição de sua produção após 12 horas de infecção e voltando a ser

expresso em grande quantidade com 120 horas de infecção. A diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa.

CXCR3 – Houve uma diferença importante entre os dois grupos, quanto à expressão de CXCR3, só com 12 horas de infecção. Nesse ponto, os AR expressavam 3 vezes mais este receptor que os BR. A partir de 48 horas ambos os grupos apresentaram os mesmos níveis de expressão (Figura 4C; Apêndice 12). A diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa.

CCR5 – Observou-se que os grupos se comportaram diferentemente na expressão de CCR5. Praticamente não houve expressão do receptor no grupo BR (Figura 4D; Apêndice 13), enquanto que o grupo AR teve moderada expressão a partir de 48 horas de infecção (cerca de 6 vezes em relação ao tempo inicial), mantendo-se nesse patamar até o último período analisado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

CCR4 – Os dois grupos produziram baixa quantidade desse receptor nas primeiras horas de infecção, continuando assim por todo o período analisado no grupo AR. Entretanto, com 48 horas, houve expressiva produção pelo grupo BR (Figura 4E). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos.

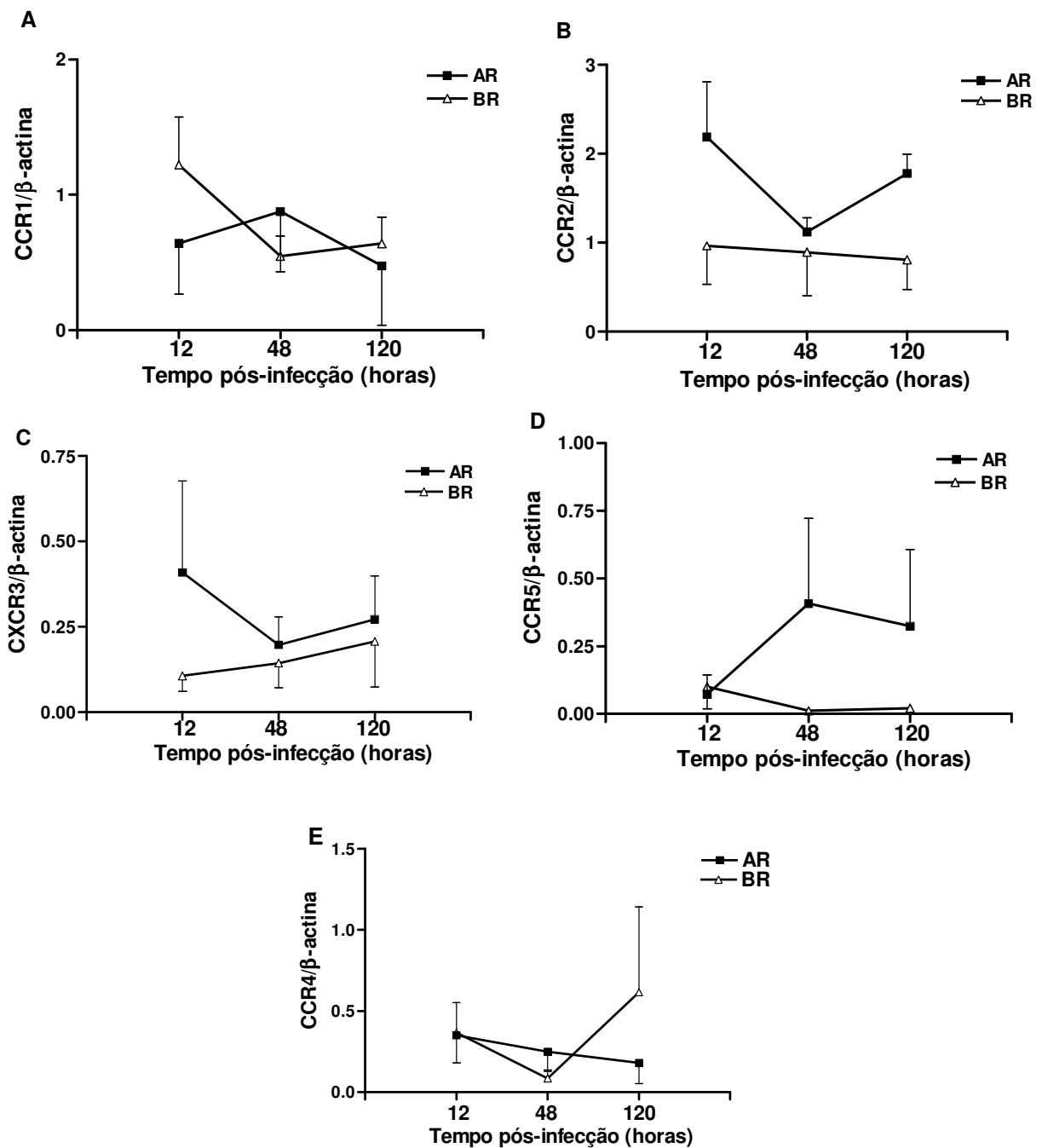


FIGURA 4 – Análise semiquantitativa da expressão de RNAm dos receptores de quimiocinas CCR1 (A), CCR2 (B), CXCR3 (C), CCR5 (D) e CCR4 (E) através de RT-PCR de CMSP de 14 indivíduos saudáveis estimuladas com *L. amazonensis*. Cada ponto representa a média \pm EP da razão entre a expressão de quimiocina e a expressão de β -actina após 12h, 48h e 120h de infecção. AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor.

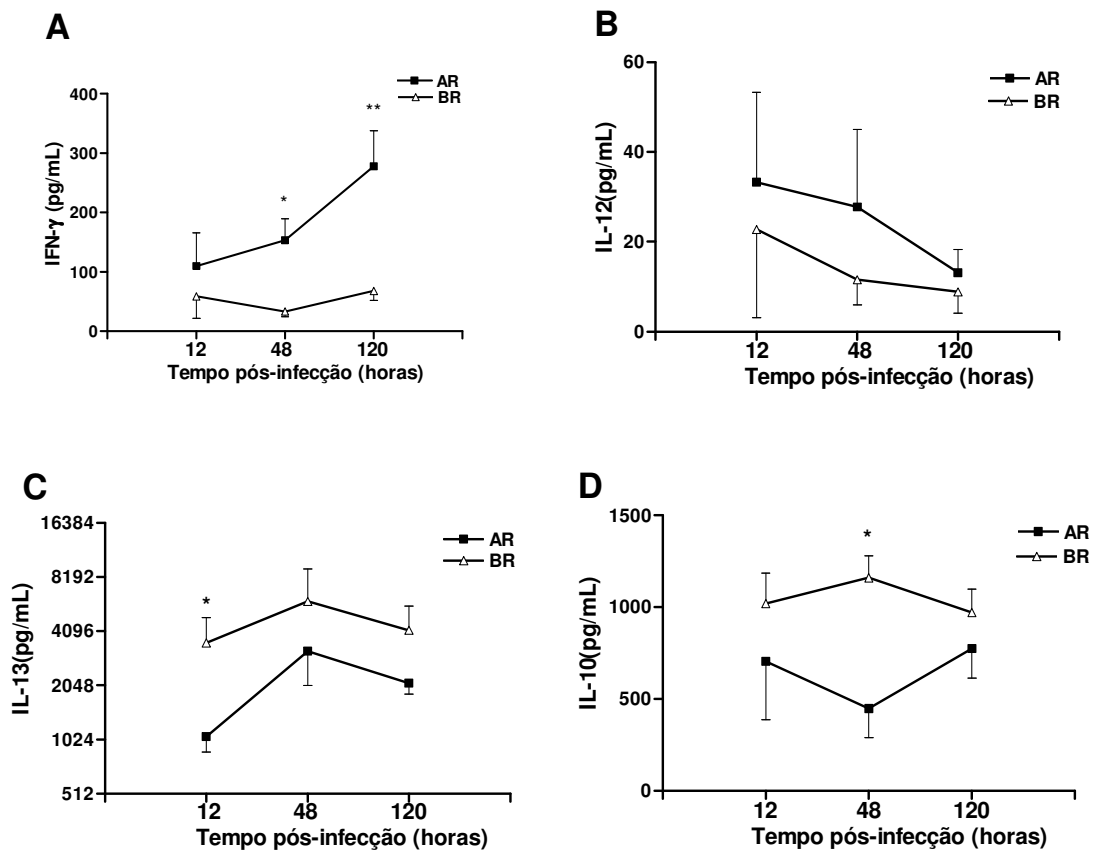


FIGURA 5 – Análise por ELISA da produção de citocinas IFN γ (A), IL-10 (B), IL-12 (C) e IL-13 (D) em culturas de CMSP estimuladas com promastigotas vivas de *L. amazonensis* após 12h, 48h, e 120h de infecção. AR = Alto Respondedor. BR = Baixo Respondedor. A barra de erro indica o desvio padrão. Asterisco indica as diferenças estatísticas significantes entre os grupos. (*) $p= 0,011$; () $p<0,001$.**

4.4 Produção de Citocinas

Foram avaliadas as concentrações de IFN γ , IL-10, IL-12 e IL-13 nos sobrenadantes das culturas de CMSP, de indivíduos sadios, estimuladas com promastigotas de *L. amazonensis*, com 12 horas, 48 horas e 120 horas de infecção.

IFN γ – Observou-se que a produção de IFN γ iniciou logo após 12 horas de infecção no grupo dos AR ($110,0 \pm 144,6$), tendo continuado crescente até 120 horas de infecção ($278,3 \pm 157,1$) (Figura 5A, Apêndice 1). No grupo BR, houve baixa secreção dessa proteína, em todo o período avaliado, apresentando uma média de $58,83 \pm 97,1$ em 12 horas e $67,99 \pm 42,9$ em 120 horas pós-infecção. A expressão entre os dois grupos foi estatisticamente significativa em 48 horas ($p=0,011$) e 120 horas ($p<0,001$).

IL-12 – Os dois grupos secretaram IL-12 de forma semelhante, sendo produzida em maior concentração em 12 horas de infecção (Figura 5B, Apêndice 14), porém o que diferenciou os dois grupos foi a produção em maiores quantidades que grupo AR, em todos os tempos analisados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

IL-13 - Ambos os grupos tiveram comportamentos semelhantes em relação à produção de IL-13, com concentrações elevadas já com 12 horas de infecção, e com um pico de produção com 48 horas de infecção (Figura 5C, Apêndice 15). O grupo BR expressou esta citocina em maior quantidade por todo o período analisado, embora a diferença entre os dois grupos só tenha sido estatística significativa somente em 12 horas de infecção ($p=0,011$).

IL-10 – Verificou-se que os dois grupos apresentaram alta concentração desta citocina nos sobrenadantes das culturas, desde o início, sendo que no grupo BR a produção foi maior que a do grupo AR durante todo o período avaliado (Figura 5D, Apêndice 16). Com 48 horas de infecção, chamou atenção a diferença entre os dois grupos, enquanto o grupo BR aumentou a concentração de IL-10, no grupo AR ela diminuiu, verificando-se, nesse momento, uma concentração 2,4 vezes maior no BR e estatisticamente significativa ($p=0,011$), indicando possivelmente que IL-10 tenha um papel importante na modulação da resposta do grupo BR.

5 DISCUSSÃO

Os estudos da leishmaniose no modelo murino mostram que as condições que definem o tipo de resposta imune adaptativa, quer a que controla a infecção ou a que permite o aumento da carga parasitária e conseqüente progressão da doença, ocorre durante a resposta inata (AFONSO; SCOTT, 1993; SCHARTON-KERSTEN; SCOTT, 1995; JI e cols., 2002). Assim, conhecer a resposta imune inata humana na infecção por *Leishmania* é fundamental para a elaboração de estratégias tanto na prevenção, através de vacinas eficazes, como no tratamento da leishmaniose.

Neste estudo foi avaliada a resposta imune inata de indivíduos sadios frente à infecção in vitro com *L. amazonensis*, analisando o perfil e a cinética de produção de citocinas e de quimiocinas, comparando a resposta dos indivíduos alto e baixo produtores de IFN γ . Sua relevância está no fato de haver escassez de dados da fase inata da resposta imune, na infecção por *Leishmania* em seres humanos. Toda gama de trabalhos sobre a resposta imune na leishmaniose humana reporta-se a dados em pacientes com leishmaniose, já com lesão estabelecida (CACERES-DITTMAR e cols., 1993; ROCHA e cols., 1999; BOURREAU e cols., 2003), e, mesmo no modelo murino, existem poucos trabalhos sobre o perfil da expressão de citocinas e quimiocinas na infecção com *L. amazonensis* (JI e cols., 2002; JI e cols., 2003).

Pompeu e cols., (2001), avaliando a resposta de citocinas nas fases inata e adaptativa inicial da resposta imune à *L. amazonensis*, mostraram que indivíduos sadios não expostos apresentam resposta imune diferenciada na infecção in vitro e na resposta in vivo pós-vacinação, contra leishmaniose. Foram observados dois tipos de resposta: uma com produção rápida de IFN γ e em concentrações elevadas, e outra com produção baixa ou mesmo sem produção dessa citocina. Tais indivíduos, com resposta inicial de baixa produção de IFN γ , apresentaram elevadas concentrações dessa citocina, seis meses depois da vacinação. Em pacientes recém-infectados com *L. braziliensis* (ROCHA e cols, 1999), ou com *L. guyanensis*, (BOURREAU e cols., 2001 a) também foi observado que parte deles apresentava resposta com baixa produção de IFN γ e que os indivíduos desenvolvem resposta tipo Th2 (BOURREAU e cols., 2003). É possível que esses indivíduos, por terem

uma resposta inicial sem ativação de macrófagos, sejam mais susceptíveis à infecção e ao desenvolvimento da doença, enquanto que os indivíduos que apresentam resposta Th1 precoce, possivelmente, controlem a infecção e apresentem cura espontânea, como tem sido observado na leishmaniose cutânea localizada (MARSDEN, P.1986; COSTA e cols., 1990; HERWALDT e cols., 1992).

Neste estudo, foi avaliada a resposta de algumas citocinas da resposta Th1 (IFN γ , IL-12) e da resposta Th2 (IL-10 e IL-13) e de algumas quimiocinas e receptores característicos preferencialmente da resposta Th1 (MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10, CCR1, CCR2, CCR5, CXCR3) (SIVEKE e cols., 1998; ROSSI; ZLOTNIK, 2000; WONG; FISH, 2003), e da resposta Th2 (I-309/CCL1 e CCR4) (BONECCHI e cols., 1998; ROSSI; ZLOTNIK, 2000; WONG; FISH, 2003) e IL-8/CXCL8 nas primeiras 120 horas de infecção de CMSP de 14 indivíduos sadios com promastigotas vivas de *L. amazonensis*. Inicialmente será discutido o perfil da resposta imune inicial do grupo AR e em seguida serão ressaltadas as alterações observadas na resposta dos indivíduos BRs.

No grupo AR, foram observadas várias quimiocinas indutoras de resposta Th1 sendo expressas em quantidade relevante, já com 12 horas de infecção, tais como MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10 e IL-8/CXCL8. Nesse momento, havia co-expressão de receptores que se ligam à MIG/CXCL9 e IP-10/CXCL10 em grande quantidade, e, em moderada, dos que se ligam à MIP-1 α /CCL3 e RANTES/CCL5 (Figura 4). O receptor de IL-8/CXCL8 não foi avaliado. As quimiocinas são quimiotáticas para células NK, células dendríticas, monócitos, linfócitos T, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (ROLLINS, 1997; LUSTER, 1998; NELSON; KRENSKY, 2001; CHRISTOPHERSON II; HROMAS, 2001; LILLARD JR. e cols., 2003). MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL10, quando se ligam aos seus respectivos receptores induzem preferencialmente a produção de IFN γ (RITTER e cols., 1996; SCHRUM, 1996; SIVEKE; HAMANN, 1998; COTTERELL e cols.,1999; DUFOUR e cols., 2002), em células NK (SCHARTON-KERSTEN; SCOTT, 1995; KIM e cols., 1998; SIVEKE; HAMANN, 1998), além de aumentar atividade citotóxica das células (MULLER e cols., 2001; ROBERTSON, 2002). A produção de IFN γ , pelas células NK, nas primeiras horas é fundamental para induzir IL-12, que sinergisticamente para produzir IFN γ .

RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, também estimulam células dendríticas a produzirem IL-12, que, por sua vez, estimula também a produção de RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 (WONG; FISH, 2003), formando uma alça de amplificação da resposta indutora de diferenciação Th1. IL-12, presente no microambiente, sinergiza com estas quimiocinas acima referidas e com MCP-1/CCL2 (PARK e cols., 2002; LILLARD JR. e cols., 2003) a produção de IFN γ . Neste trabalho, IL-12 foi observada com 12 horas de infecção no grupo AR (Figura 5B). Todas as células e moléculas estariam, assim, construindo um ambiente favorável para a diferenciação e expansão de linfócitos Th1. MCP-1/CCL2 e MIP-1 α /CCL3 podem agir também aumentando a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, aumentando, assim, sua capacidade leishmanicida (BRANDONÍSIO e cols., 2002) e RANTES/CCL5 pode também induzir apoptose da célula alvo, através da liberação de citocromo c no citosol (WONG; FISH, 2003), o que pode funcionar como um mecanismo de eliminação de macrófago infectado ou como modulador da resposta inflamatória.

Nossos dados estão de acordo com os de Ritter e Korner (2002), que observaram expressão elevada de RNAm de MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9 e IP-10/CXCL10 e baixa de MIP-1 α /CCL3, na lesão de pacientes com LCL. Com relação a MIP-1 α /CCL3, nosso achado difere do encontrado pelos autores. Em nossos dados, MIP-1 α /CCL3 apresentou expressão somente nas primeiras 48 horas de infecção, ficando praticamente sem expressão com 120 horas. Como os dados dos autores acima referidos reportam-se a lesões de pacientes, isto implica que é uma resposta com mais tempo de infecção, o que possivelmente explique a baixa expressão dessa quimiocina, em relação aos nossos achados, que analisam a primeira semana de infecção.

Analisando algumas moléculas que estimulam resposta Th2, como IL-13 e IL-10, observou-se que, nesse momento, elas também foram expressas em quantidades significantes nos indivíduos ARs, (Figura 5). Isso parece indicar que aparentemente ocorreu apresentação de antígenos que estimulam quimiocinas e citocinas indutoras de resposta Th2, simultaneamente, o que parece uma possibilidade bem plausível, visto que, na infecção com parasito vivo, ocorre uma grande diversidade de moléculas antigênicas, que podem se ligar a diferentes receptores tipo “*toll like*”, e estimular diferentes vias de sinalização intracelulares e,

conseqüentemente, respostas diferentes (CHATELAIN e cols., 1999; MATTHEWS; cols., 2000; BROSSARD e cols., 2000; KANE; MOSSER, 2001; BOURREAU e cols., 2001 a e b).

Com 48 horas de infecção, verificou-se que RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 permaneceram com altas concentrações (Figuras 2 e 3), associadas à crescente produção de IFN γ . Aparentemente estas 48 horas iniciais de infecção, com este tipo de resposta inicial, resultaram em estímulo suficiente para desencadear uma resposta Th1, porque, a partir desse momento, observou-se um aumento progressivo e significativo na produção de IFN γ e o declínio na concentração das quimiocinas e citocinas indutoras de resposta Th1 (Figuras 2, 3A, 3C, 5B). De acordo com dados da literatura, MIP-1 α /CCL3 e MIP-1 β /CCL4 são expressas somente nas primeiras horas, enquanto MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 apresentam expressão por mais tempo (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2000). Nas primeiras 48 horas de infecção, verificou-se que havia uma correlação negativa entre IFN γ e IL-10 (Figura 6), no entanto, há de se observar, também, que a partir daí ocorreu uma leve elevação na concentração IL-10 e IL-13 (Figuras 5C, 5D), passando a se verificar uma correlação positiva entre IFN γ e estas duas citocinas, o que pode ser interpretado como o início de uma modulação da resposta Th1, através da resposta Th2, para manter a homeostasia do sistema; inibindo resposta lesiva decorrente da produção alta de TNF- α e IFN- γ (FIORENTINO e cols., 1991; PALUDAN, 1998; ROSSI; ZLOTNIK, 2000).

Com 120 horas de infecção, observou-se expressão significativa somente de MIG/CXCL9, assim como de seu receptor, CXCR3. Enquanto as demais quimiocinas estudadas apresentaram expressão mais precocemente, a expressão de MIG/CXCL9 só ocorreu mais tardiamente (Figura 3B). Como nesse momento, IL-13 e IL-10 estavam elevadas, indicando expansão de linfócitos Th2, é possível que a expressão tardia de MIG/CXCL9 possa agir para competir com o receptor CCR3 (LOETSCHER e cols., 2001), que é indutor de resposta Th2, possivelmente para modular a resposta Th2 que estava ocorrendo. Em síntese, na interação das respostas entre o hospedeiro e a *Leishmania*, parece ocorrer uma dinâmica interação de moléculas indutoras e inibidoras de diferenciação Th1 e Th2, que, nos indivíduos ARs, resultaram num predomínio de resposta Th1.

Em relação à resposta do grupo BR, nas primeiras 12 horas, chamou atenção a falta de expressão de RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3, IP-10/CXCL10 (Figuras 2A, 2B, 3A), todas elas indutoras de diferenciação Th1 (SIVEKE; HAMANN, 1998; LOETSCHER e cols., 2001; ZAPH; SCOTT, 2003; LILLARD JR. e cols., 2003); o que parece indicar que *L. amazonensis* induz uma supressão da expressão das quimiocinas nos indivíduos BR. Nossos dados estão de acordo com o que acontece na infecção murina por *L. amazonensis*, onde também foi observado um atraso com diminuição da expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias nas primeiras semanas de infecção (JI e cols., 2003). É possível que fatores genéticos possam estar implicados no desenvolvimento desta resposta, ou o tipo de antígeno que foi apresentado, porque POMPEU e cols. demonstraram que CMSP de indivíduos BR, que não produzem IFN γ , quando estimuladas com promastigotas, passam a produzi-lo se estimuladas com alguns antígenos purificados, derivados de *Leishmania* (Dados não publicados), assim como a cepa utilizada. Teixeira e cols. (2004, *In press*) demonstraram que diferentes cepas de *L. braziliensis* podem apresentar diferentes padrões de expressão de quimiocinas, levando a um recrutamento diferenciado das células inflamatórias que influenciarão na manifestação da doença.

MIP-1 β /CCL4, quando se liga ao receptor CCR5, pode induzir produção de IFN γ (LILLARD JR. e cols., 2003). Nos BRs ela estava mais elevada que nos ARs, o que parece paradoxal, no entanto, deve-se ressaltar que não houve expressão do receptor CCR-5 (Figura 4D), ao qual ela se liga para induzir uma resposta tipo Th1 (BONECCHI e cols., 1998; LILLARD JR. e cols, 2003). Merece destaque também a moderada expressão de CCR4, um marcador de células Th2, observado no grupo BR (Figura 4E), enquanto sua expressão pelos ARs foi mínima ao longo do tempo estudado.

Neste estudo não foi avaliado o receptor CCR8, que quando se liga a MIP-1 β /CCL4 pode induzir diferenciação Th2 em vez de Th1 (LILLARD JR. e cols., 2003). Seria importante avaliar, posteriormente, sua expressão nos BRs, para verificar se ele atua modulando negativamente a produção de IFN γ .

Outro aspecto que merece ser avaliado é a expressão de MCP-1 nos BRs. Essa quimiocina pode induzir produção de IFN γ quando se encontra em concentrações elevadas, mas em baixa concentração ela pode levar à resposta Th2 (SIVEKE; HAMANN, 1998). Nos BRs, ela e o seu respectivo receptor, CCR2,

ocorreram em baixas concentrações (Figuras 2C e 4B), possivelmente favorecendo uma resposta Th2 e inibindo a produção de IFN γ .

Merece destaque especial a produção de IL-13 e de IL-10. Ambos os grupos apresentaram o mesmo comportamento na produção de IL-13, só que as concentrações nos BRs foram sempre maiores, variando de 2-3 vezes mais que nos ARs. Já com 12 horas de infecção, IL-13 encontrava-se em concentrações 3 vezes maior que nos ARs (Figura 5C), tendo um pico de produção com 48 horas de infecção e permanecendo elevada durante todo o período avaliado. Como IL-12 é uma citocina fundamental para induzir a produção inicial de IFN γ (BOGDAN e cols., 1993; REINER e cols., 1994), embora ela estivesse sendo produzida no grupo BRs, como observado na figura 5B, sua ação aparentemente estava sendo bloqueada pela IL-13, o que favoreceu a formação de um microambiente indutor de diferenciação Th2.

Em relação a IL-10, o comportamento de produção dessa citocina foi diferente nos dois grupos. Ambos os grupos apresentaram concentrações iniciais elevadas de IL-10, no entanto, com 48 horas de infecção, eles se comportaram diferentemente, enquanto ocorreu importante redução nos ARs, aumentou de modo significativo nos BRs (Figura 5D) e uma redução também significativa de IL-12 (Figura 5B). O tempo 48 horas de infecção parece ser um delineador de resposta, enquanto nos ARs ocorre produção crescente de IFN γ e, nos BRs, ela permanece muito baixa (Figura 5A).

Outro aspecto que deve estar contribuindo para a baixa produção de IFN γ pode ser a produção tardia de IP-10 (Figura 3A). MIG/CXCL9 e IP-10/CXCL10 são antagonistas de CCR3 (LOETSCHER e cols., 2001), um indutor de resposta Th2, como o receptor de MIG/CXCL9, CXCR3, não estava sendo expresso e IP-10/CXCL10 não estava sendo produzido, nas primeiras horas, aparentemente isso contribuía para a formação de um microambiente favorável para diferenciação de linfócitos Th2 nos indivíduos BRs.

I-309/CCL1, uma quimiocina com atividade quimiotática para monócito, célula B, célula T, tímócito, é induzida por citocinas tipo Th2 e parece que controla o tráfego de células Th2 para o sítio da resposta inflamatória. Ela liga-se ao receptor CCR8 que é expresso em monócitos, células T (ROMAGNAMI, 2000; LUSTER, 1998, 2002; CHRISTOPHERSON II; HROMAS, 2001; NELSON; KRENSKY, 2001) e

células endoteliais (HAQUE e cols., 2004). Quando se liga ao receptor CCR8 é considerado um potente indutor de resposta Th2 (ZINGONI e cols., 1998). Chama atenção a resposta observada dessa quimiocina, neste estudo, onde se verificou que o grupo BR praticamente não expressou I-309/CCL1, enquanto que sua expressão, embora baixa no AR, foi maior que a do BR, significando que, aparentemente ela não tem participação na modulação da resposta Th2 no BR, e sua expressão no grupo AR pode ser interpretada como vinculada à ativação de células NK, dado que, até o momento, I-309/CCL1 em seres humanos liga-se exclusivamente ao receptor CCR8, que pode ser expresso também em células NK ativadas por IL-12 (INNGJERDINGEN e cols., 2000). Uma melhor avaliação, com um número maior de amostras, merece ser realizada para definir com mais precisão o real papel de I-309/CCL1 e de CCR8 na modulação da resposta imune na infecção por *L. amazonensis*, como também em relação a outros receptores indutores de resposta imune Th2, como CCR3 e CXCR2.

Em síntese, demonstramos que na infecção in vitro por *L. amazonensis*, os indivíduos ARs desenvolveram uma resposta mista, com predomínio de Th1 e que nos BRs ocorreu modulação da resposta para o tipo Th2. A resposta estava associada à diminuição da expressão de RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3, IL-8/CXCL8, CCR5, CXCR3 e à presença de concentrações elevadas de IL-13 e IL-10. No entanto, ainda resta esclarecer como o processo é desencadeado, isto é, se a *L. amazonensis* induz a supressão das quimiocinas tipo Th1, ou se é o mecanismo proposto por Bourreau e cols. (2001 a) que imputam à IL-13 um papel importante nesse processo de produção. Segundo os autores, IL-13 elevada agiria inibindo a síntese da cadeia beta do receptor de IL-12 (REINER e cols., 1994; MATTHEWS e cols., 2000), o que iria bloquear a ativação das células NK e modular a resposta no sentido Th2. Novos estudos, com bloqueio de quimiocinas e/ou citocinas e a avaliação das primeiras horas de infecção serão necessários para melhor elucidar os mecanismos de supressão induzidos pela *L. amazonensis*,

6 CONCLUSÕES

- CMSP de indivíduos baixo respondedores de IFN γ desenvolveram resposta imune mista, com predomínio de Th2, quando estimuladas com *L. amazonensis*, enquanto que os alto respondedores desenvolveram uma resposta mista com predomínio de Th1;
- A imunossupressão desenvolvida pelos indivíduos baixo respondedores está associada a:
 - importante supressão da expressão de MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5 e IP-10/CXCL10, moléculas indutoras da resposta protetora Th1 , já com 12 horas de infecção e de MIG e IL-8 com 48 horas;
 - importante supressão de CCR5 e de CXCR3, receptores de RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3, e de MIG/CXCL9 e IP-10/CXCL10, respectivamente;
 - moderada expressão de CCR4, marcador preferencial de células Th2;
 - presença de concentrações elevadas de IL-13 e de IL-10;
- A produção de IL-10 e IL-13, nos eventos iniciais da infecção nos BRs, parece ter papel relevante na modulação da resposta imune, favorecendo a diferenciação Th2;
- A resposta dos indivíduos alto respondedores, com grande produção de IFN γ , está associada a:
 - expressão elevada, nos momentos iniciais da infecção, de RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3, MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10 e IL-8/CXCL8, CCR1, CCR2 e CXCR3
 - concentrações significativas de IL-13 e IL-10;
- A diferenciação da resposta imune nos dois grupos parece ser definida nas primeiras 48 horas de infecção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LITHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Citocinas. In: ABBAS, A. K.; LITHTMAN, A. H.; POBER, A. H.. **Imunologia celular & Molecular**, 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter. 2000. cap. 12. p.255 -284. cap. 13. p. 285 – 303.

AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 61, n.7, p.2952-2959,1993.

ALMEIDA, M. C.; VILHENA. V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. **Annual Review Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.7, p.861-870, 2003.

BARRAL, A.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; GRIMALDI, G, Jr.; MOMEM, H.; CARVALHO, E. M. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 35, n.4, p.732-4, 1986.

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.

BOGDAN, C.; GESSNER, A.; ROLLINGHOFF, M. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. **Immunobiology**, v.189, p. 356-396, 1993.

BONECCHI, R.; BIANCHI, G.; BORDIGNON, P. P.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; GRAY, P. A.; MANTOVANI, A.; SINIGAGLIA, F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 1, p. 129-134, 1998.

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.; GARDON, J.; PRADINAUD, R.; PASCALIS, H.; PRÉVOT-LINGUET, G.; KARIMINIA, A.; PASCAL, L. Th2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and

precede the development of Th1 responses. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 2244-2246, 2003.

BOURREAU, E.; PRÉVOT, G.; PRADNAUD, R.; LAUNOIS, P. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 953-959, 2001 a.

BOURREAU, E.; PRÉVOT, G.; PRADNAUD, R.; LAUNOIS, P. Unresponsiveness of specific T cells to IL-12 is associated with active cutaneous leishmaniasis owing to *Leishmania guyanensis*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 54, p.335-339, 2001 b.

BRANDT, E.; WOERLY, G.; YOUNES, A. B.; LOISEAU, S.; CAPRON, M. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v.68(1), p.125-130, 2000.

BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A.; FUMAROLA, I.; SISTO, M.; LEOGRANDE, D.; ACQUAFREDDA, A.; SPINELLI, R.; MITOLO, V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. **Clinical Experimental Medicine**, v.2, n. 3, p. 125-9, 2002.

BROSSARD, P.; ZOBYWALSKI, A.; GRÜNEBACH, F.; BEHNKE, L.; STUHLER, G.; REICHARDT, V. L.; KANZ, L.; BRUGGER, W. Tumor necrosis factor α and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. **Cancer Research**, v. 60, p.4485-4492, 2000.

CACERES-DITTMAR, G.; TAPIA, F. J.; SANCHEZ, M. A.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R.; CONVIT, J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. **Clinical Experimental Immunology**, v.91(3), p.500-505, 1993.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, p. 315-325, 1994.

CHAN, M. M-Y. T cell response in murine *Leishmania mexicana amazonensis* infection: production of interferon- γ by CD8+ cells. **European Journal of Immunology**, v.23, p. 1181-1184, 1993.

CHATELAIN, R.; MAUZE, S.; COKKMAN, R. L. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. **Parasite Immunology**, v.21, p. 211-218, 1999.

CHRISTOPHERSON II, K.; HROMAS, R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. **Stem Cells**, v. 19, p. 388-396, 2001.

COSTA, J. M.; MARSDEN, P. D.; LLANOS-CUENTAS, E. A.; NETTO, E. M.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; ROSA, A. C.; CUBA, C. C.; MAGALHÃES, A. V.; BARRETO, A. C. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in a Field Clinic in Bahia, Brazil: a Report of Eight Cases. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 89(6), p. 319-323, 1986.

COSTA, J. M.; VALE, K. C.; FRANCA, F.; SALDANHA, A. C.; DA SILVA, J. O.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. D.; MAGALHÃES, A. V.; SILVA, C. M.; SERRA NETO, A. Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *Leishmania viannia braziliensis* in cutaneous lesions. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 23(4), p.205-208, 1990.

COSTA, J. M.; SALDANHA, A. C.; SILVA, C. M.; BRANCO, M. dos R.; BARRAL, A.; CARVALHO, E. M.; BITTENCOURT, A. L. Spontaneous regional healing of extensive skin lesions in Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 28(1), p. 45-47, 1995.

COTTERELL, S. E. J.; ENGWERDA, C. R.; KAUE, P. M. *Leishmania donovani* infection initiates T-cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T-cell-dependent manner. **European Journal of Immunology**, v.29, p.203-214, 1999.

DUFOUR, J. H.; DZIEJMAN, M.; LIU, M. T.; LEUNG, J. H.; LANE, T. E.; LUSTER, A. D. IFN- γ inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. **The Journal of Immunology**, v. 168, p.3195-3204, 2002.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **Journal of Immunology**. v.146(10), p.3444-3451, 1991.

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. N. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . **Journal of Immunology**. v.145, p.4290-4297, 1990.

GRIMALDI, G. Jr.; McMAHON-PRATT, D. Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. **Progress in Clinical Parasitology**. v.2, p.73-118, 1991.

GRIMALDI, G. Jr.; MOMEM, H.; NAIFF, R. D.; McMAHON-PRATT, D.; MARRETT, T. V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand lies in the Amazon region of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n.6, p.645-61, 1991.

HAQUE, N. S.; FALLON, J. T.; PAN, J. J.; TAUBMAN, M. B.; HARPEL, P. C. Chemokine receptor-8 (CCR8) mediates human vascular smooth cell muscle chemotaxis and metalloproteinase-2 secretion. **Blood**. v. 104, n.4. p. 1296-304, 2004.

HERWALDT, B. L.; ARANA, B. A.; NAVIN, T. R. The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **The Journal of Infectious Diseases**. v.165(3), p.518-527, 1992.

HIMMELRICH, H.; PARRA-LOPEZ, C.; TACCHINI-COLTIER, F.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor β 2-chain expression on CD4+ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. **The Journal of Immunology**. v.161, p.6156-6163, 1998.

INNGJERDINGEN, M.; DAMJ, B.; MAGHAZACHI, A. A. Human NK cells express CC chemokine receptors 4 and 8 and respond to thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine, and I-309. **Journal of Immunology**, v. 164, n.8, p.4048-54, 2000.

JI, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n.4, p. 338-345, 2002.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokine and chemokine at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity** v.71, n.8, p.4178-4288, 2003.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v.166, 2001.

KEMP, M. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human leishmania infections. **APMIS**, Supplement 68, v. 105, p.5-53, 1997.

KIM, J. J.; NOTTINHAM, L. K.; SIN, J. I.; TSAI, A.; MORRINSON, L.; OH, J.; DANG, K.; HU, Y.; KAZAHAYA, K.; BENNETT, M.; DENTCHEV, T.; WILSON, D. M.; CHALIAN, A. A.; BOYER, J. D.; AGADJANYAN, M. G.; WEINER, D. B. CD8 positive T cells influence antigen-specific immune responses through the expression of chemokines. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 6, p.1112-1124, 1998.

LILLARD JUNIOR, J. W.; SINGH, U. P.; BOYAKA, P. N.; SINGH, S.; TAUB, D. D.; McGHEE, J. R. MIP-1 α and MIP- β differentially mediate mucosal and systemic adaptive immunity. **Blood**, v.101, n.3, p. 807-814, 2003.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **The Journal of Immunology**, 145(12), p. 4306-4310, 1990 a.

LIEW, F. Y., MILLOT, S., PARKINSON, C., PALMER, R. M. J., MENDONÇA, S. Macrophage killing of *Leishmania* Parasite In Vivo is Mediated by Nitric Oxide from L Arginine. **The Journal of Immunology**, v.144, p. 4794-4797, 1990 b.

LOETSCHER, P.; PELLEGRINO, A.; GONG, J-H.; MATTIOLI, I.; LOETSCHER, M.; BARDI, G.; BAGGIOLINI, M.; CLARK-LEWIS, I. The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP-10, are natural antagonists for CCR3. **The Journal of Biological Chemistry**. V.276, n.5, p. 2986-2991, 2001.

LUSTER, A. D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n.7, p. 436-444,1998.

LUSTER, A. D. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. **Current Opinion in Immunology**, v.14, n. 1, p. 129-135, 2002.

MARSDEN, P. Mucosal leishmaniasis ("Espundia" Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.80, p.859-75, 1986.

MATTHEWS, D. J.; EMSON, C. L.; MCKENZIE, G. J.; JOHN, H. E.; BACKWILL, J. M.; MCKENZIE, N. J. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. **The Journal of Immunology**, v.164, p.1458-1462, 2000.

MELBY, P. C. Recent developments in leishmaniasis. **Current Opinion of Infectious Diseases**, v.15, n.5, p.485-490, 2002.

MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R.: Morphology, ultrastructure, and life cycles. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R., (Eds.) – **The leishmaniasis in biology and medicine**, vol. I, London: Academic Press, p. 122-128, 1987.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v.7, p.145-173, 1989.

MÜLLER, K.; vanZANDBERGER, G.; HANSEN, B.; LAUFS, H.; JAHNKE, N.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Chemokines natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v.190, p.73-76, 2001.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **The American Society of Hematology**, v. 95, n. 10, p. 3032-3043, 2000.

MURPHY, P. M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I. F.; HEBERT, C. A.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L. H.; OPPENHEIN, J. J.; POWER, C. A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacological Reviews**, v.52, n.1, p. 145-176, 2000.

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**. v.72, p.1506, 1983.

NELSON, P. J.; KRENSKY, A. L. Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. **Immunity**, v.14, p.377-386, 2001.

NOBEN-TRAUTH, H.; HU-LI, J.; PAUL, W. E. Conventional naïve CD4⁺ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. **The Journal of Immunology**. v.165(7), p.3620-3625, 2000.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; GRIMALDI, G, Jr.; MOMEM, H.; PACHECO, R. S.; MARZOCHI, M. C.; McMAHON-PRATT, D. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani chagasi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 81, n.3, p.303-9,1986.

OMS. Disponível em:< <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.html/>>. Acesso em: 26 abr. 2004.

OPAS. Disponível em:<<http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/SAUDEBR./>>. Acesso em: 26 abr. 2004.

PALUDAN, S. R. Interleukine-4 and interferon- γ : the quintessence of a material antagonistic relationship. **Scandinavian Journal of Immunology**. v.48, p. 459-468, 1998.

PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B.; KOPF, M.; SCOTT, P. The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v.168, 2002.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p. 1-13, 1996.

PEARSON, R. D.; JERÔNIMO, S. M. B.; SOUSA, A. Q. Leishmaniasis. Guerrant, R. L.; Walker, D. H.; Weller, P. F. In: **Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, & Practice**. Philadelphia: Churchill Livingstone. 1999. v. 1. cap.74, p. 797-813.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q.; JERÔNIMO, S. M. B. *Leishmania* species: visceral (Kala-Azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (Edits). In: **Principles and Practice of Infectious Diseases**, 5 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2000. cap. 265, p. 2831-2842.

POMPEU, M. M. L.; BRODSKY, C.; TEIXEIRA, M. J.; CLARÊNCIO, J.; van WEYENBERG, J.; COELHO, I. C. B.; CARDOSO, S. A.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vitro response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7453-7460, 2001.

RANDOLPH, D. A.; HUANG, G.; CARRUTHERS, C. J.; BROMLEY, L. E.; CHAPLIN, D. D. The role of CCR7 in Th1 and Th2 cell localization and delivery of B cell help in vivo. **Science**. 286(5447), p. 2159-2162, 1999.

REINER, S. L.; ZHENG, S.; WANG, Z. E.; STOWRING, L.; LOCKSLEY, R. M. Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. **Journal of Experimental Medicine**. 179(2), p.447-456, 1994.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to Leishmania major. **Annual Review of Immunology**. v. 13, p.151-177, 1995.

RITTER, U.; KÖRNER, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.24, p. 295-301, 2002.

RITTER, U.; MOLL, H.; LASKAY, T.; BROCKER, E.; VELAZCO, O.; BECKER, I.; GILLITZER, R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.173, p. 699-709, 1996.

ROBERTSON, M .J. Role of chemokines in biology of natural killer cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n.2, p. 173-83, 2002.

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.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, v.90, p. 909-928, 1997.

ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 85, p. 9-18, 2000.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines their receptors. **Annual Review of Immunology**, v.18, p.217-242, 2000.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; MACKAY, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. **Immunology Today**, 19 (12), p. 568-574, 1998 a.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; MACKAY, C. R. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, 87 (6), p. 875-883, 1998 b.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. **Immunological Reviews**, v.177, p.134-140, 2000.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J. A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BAZZONI, F.; CASSATELLA, M. A., The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological Reviews**, v.177, p.195-203, 2000.

SCHARTON-KERSTEN, T.; SCOTT, P. The role on the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v.57, p.515-522. 1995.

SCHRUM, S.; PROBST, P.; FLEISCHER, B.; ZIPFEL, P. F. Z. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1 α , and MIP-1 β , and RANTES is associated with a type 1 immune response. **The Journal of Immunology**, v. 157, p.3598-3604, 1996.

SCOTT, P. The role of Th1 and Th2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v.68, p. 369-372, 1989.

SCOTT, P. IFN γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v.147, p. 3149-3155, 1991.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to disease in Amazonian Brazil – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99(3), p.239-251, 2004.

SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C. M. L.; MATTOS, M. R. F.; POMPEU, M. M. L. Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. V.99, n.550, p.79-87, 2004.

SIMÕES-MATTOS, L.; SILVA, F. M. O.; BEVILAQUA, C. M. L.; MATTOS, M. R. F.; MACEDO, I. T. F.; SOUZA, P. T.; MONTEIRO, C. L. B.; de SOUSA, R. N.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. M. L.; OLIVEIRA-LIMA, J. W. Gatos domésticos como reservatórios de *Leishmania braziliensis*. **Anais do Congresso de Parasitologia Veterinária**. 2004. *In press*.

SIVEKE, J. T.; HAMANN, A. T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. **The Journal of Immunology**, v.160, p.550-554, 1998.

SUTTERWALA, F. S.; MOSSER, D. M. The taming of IL-12: suppressing the production of proinflammatory cytokines. **Journal of Leukocyte Biology**. 65, p. 543-551, 1999.

SYPEK, J. P.; CHUNG, C. L.; MAYOR, S. E. H.; SUBRAMANYAM, J. M.; GOLDMANN, S. J.; SIEBURTH, D. S.; WOLFAND, 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**, v.177, p.1797-1802, 1993.

TEIXEIRA, M. J. FERNANDES, J. D., ANDRADE B. B, POMPEU, M. M. L., SILVA, J. S., BRODSKYN, C. I., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A. Distinct courses of cutaneous Leishmaniasis are dependent on early chemokine expression patterns. **Infection and Immunity**, *In press*.

THEODOS, C. M.; POVINELLI, L.; MOLINA, R.; SHERRY, B.; TITUS, R. G. Role of tumor necrosis factor in macrophages leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. **Infection and Immunity**. v.59, p.2839-2842, 1991.

VIEIRA, M. G. S.; OLIVEIRA, F.; ARRUDA, S.; BITTENCOURT, A. L.; BARBOSA JUNIOR, A. A.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.979-983, 2002.

WONG, M. M.; FISH, E. N. Chemokines: attractive mediators of the immune response. **Seminars in Immunology**, v.15, p. 5-14, 2003.

ZAPH, C.; SCOTT, P. Interleukine-12 regulates gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v.71, n. 3, p. 1587-1589, 2003.

ZINGONI, A.; SOTO, H.; HEDRICK, J. A.; STOPPACCIARO, A.; STORLAZZI, C. T.; SINIGAGLIA, F.; D'AMBROSIO, D.; O'GARRA, A.; ROBINSON, D.; ROCCHI, M.; SANTONI, A.; ZLOTNIK, A.; NAPOLITANO, M. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. **The Journal of Immunology**, v. 161, n.2, p.547-51, 1998.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v.12, p.121-127, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Quantificação de IFN γ nos sobrenadantes de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo		Tempo pós-infecção			Grupo		Tempo pós-infecção		
AR	12h	48h	120h	BR	12h	48h	120h		
1	379,800	309,880	242,820	1	0,000	24,580	48,160		
2	0,000	68,140	583,660	2	0,000	41,760	30,240		
3	0,000	29,080	394,920	3	219,600	77,580	83,700		
4	0,000	95,680	156,600	4	0,000	5,140	66,780		
5	170,000	160,000	160,000	5	12,200	42,040	134,920		
6	30,000	190,000	190,000	6	0,000	33,940	102,160		
7	190,000	220,000	220,000	7	180,000	10,000	10,000		

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor

APÊNDICE 2 – Quantificação de MIP-1 α no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo		Tempo pós-infecção			Grupo		Tempo pós-infecção		
AR	12h	48h	120h	BR	12h	48h	120h		
1	1,865	0,365	0,000	1	0,145	0,000	0,265		
2	2,005	1,675	1,580	2	0,000	0,000	0,000		
3	1,215	0,705	0,000	3	0,550	0,290	0,380		
4	0,000	0,000	0,020	4	0,025	0,070	0,120		
5	1,175	1,940	0,000	5	0,640	0,150	0,200		
6	1,750	0,540	0,000	6	0,095	0,090	0,445		
7	0,780	0,275	0,200	7	1,360	0,510	0,290		

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor

APÊNDICE 3 – Quantificação de RANTES no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo AR	Tempo pós-infecção			Grupo BR	Tempo pós-infecção		
	12h	48h	120h		12h	48h	120h
1	1,125	0,565	0,000	1	0,060	0,120	0,170
2	0,395	0,520	0,450	2	0,340	0,060	0,515
3	0,345	0,210	0,040	3	0,220	0,105	0,125
4	0,920	1,380	0,720	4	0,485	0,645	0,205
5	1,255	2,690	1,160	5	0,415	0,035	0,000
6	0,280	0,265	0,475	6	0,015	0,015	0,000
7	1,390	0,155	1,135	7	0,000	0,080	0,000

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor

APÊNDICE 4 – Quantificação de MCP-1 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo AR	Tempo pós-infecção			Grupo BR	Tempo pós-infecção		
	12h	48h	120h		12h	48h	120h
1	0,7300	0,000	0,000	1	0,735	0,000	0,000
2	0,7500	0,595	0,000	2	0,690	0,225	0,855
3	1,3650	0,945	0,430	3	0,580	1,370	0,000
4	1,5900	1,395	0,000	4	1,470	0,870	0,000
5	0,5200	1,820	0,850	5	0,085	0,245	0,770
6	0,6200	0,000	0,140	6	0,055	0,030	0,000
7	0,7800	0,625	0,550	7	0,700	0,000	0,500

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor

APÊNDICE 5 – Quantificação de MIP-1 β no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo	Tempo pós-infecção			Grupo	Tempo pós-infecção		
	AR	12h	48h		120h	BR	12h
1	0,000	0,385	0,000	1	0,280	0,075	0,030
2	0,510	0,590	0,935	2	0,280	0,075	0,030
3	0,275	0,115	0,000	3	2,460	1,555	1,975
4	0,165	0,000	0,150	4	0,510	0,590	0,935
5	0,710	1,425	0,300	5	0,075	0,000	0,000
6	0,670	0,270	0,000	6	0,285	1,470	2,100
7	0,280	0,330	0,000	7	0,550	0,290	0,250

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor

APÊNDICE 6 – Quantificação de IP-10 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo	Tempo pós-infecção			Grupo	Tempo pós-infecção		
	AR	12h	48h		120h	BR	12h
1	0,460	0,060	0,080	1	0,000	0,360	1,030
2	0,000	0,005	0,000	2	0,340	0,735	3,155
3	1,070	0,695	0,805	3	0,485	0,255	0,345
4	0,535	0,975	0,380	4	0,355	0,600	1,255
5	0,500	0,525	0,390	5	0,005	0,140	0,000
6	1,240	0,020	0,965	6	0,030	0,015	0,000
7	0,785	0,865	0,140	7	0,430	0,520	0,600

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor

APÊNDICE 7 – Quantificação de MIG no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo	Tempo pós-infecção			Grupo	Tempo pós-infecção		
	AR	12h	48h		120h	BR	12h
1	0,125	0,000	3,030	1	0,075	0,000	0,110
2	0,305	0,280	0,570	2	1,510	0,460	2,440
3	0,085	0,220	0,355	3	3,735	2,065	1,845
4	0,030	1,165	0,765	4	1,395	0,790	1,010
5	0,000	0,035	0,000	5	0,625	0,330	0,910
6	0,425	0,300	0,170	6	0,345	1,260	1,480
7	0,000	0,000	0,000	7	0,235	0,275	0,275

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor

APÊNDICE 8 – Quantificação de IL-8 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo	Tempo pós-infecção			Grupo	Tempo pós-infecção		
	AR	12h	48h		120h	BR	12h
1	1,575	0,285	0,000	1	0,435	1,320	0,575
2	0,340	1,545	0,880	2	0,000	0,000	0,000
3	0,210	0,110	0,000	3	2,175	0,305	2,095
4	0,430	0,575	0,000	4	0,755	0,385	0,145
5	1,835	3,895	2,025	5	0,995	0,415	0,000
6	1,295	1,005	0,955	6	2,455	0,500	0,000
7	0,435	0,000	0,000	7	0,590	0,130	0,395

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor

APÊNDICE 9 – Quantificação de I-309 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo		Tempo pós-infecção			Grupo		Tempo pós-infecção		
AR	12h	48h	120h	BR	12h	48h	120h		
1	0,000	0,000	0,000	1	0,000	0,000	0,170		
2	0,000	0,000	0,130	2	0,000	0,000	0,000		
3	0,000	0,000	0,000	3	0,000	0,000	0,000		
4	0,000	0,000	0,000	4	0,000	0,000	0,000		
5	0,270	0,640	0,190	5	0,000	0,000	0,000		
6	0,160	0,320	0,200	6	0,000	0,000	0,000		
7	0,000	0,270	0,140	7	0,000	0,180	0,170		

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor

APÊNDICE 10 – Quantificação de CCR1 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo		Tempo pós-infecção			Grupo		Tempo pós-infecção		
AR	12h	48h	120h	BR	12h	48h	120h		
1	1,760	0,7800	0,000	1	0,370	0,190	0,555		
2	0,270	2,1300	1,785	2	0,675	0,250	0,270		
3	0,390	0,5500	0,000	3	1,920	0,860	1,150		
4	0,145	0,0450	0,115	4	0,280	0,385	0,650		
5	NR	NR	NR	5	2,130	0,470	0,000		
6	NR	NR	NR	6	1,950	1,120	1,210		
7	NR	NR	NR	7	NR	NR	NR		

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor; NR= Não realizado

APÊNDICE 11 – Quantificação de CCR2 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo	Tempo pós-infecção			Grupo	Tempo pós-infecção		
	AR	12h	48h		120h	BR	12h
1	2,695	0,950	1,710	1	0,000	0,000	0,030
2	1,830	1,585	1,290	2	0,000	0,000	0,000
3	3,560	0,870	1,765	3	1,675	2,010	2,095
4	0,670	1,080	2,345	4	0,025	0,045	0,440
5	NR	NR	NR	5	2,175	0,530	1,230
6	NR	NR	NR	6	1,930	2,785	1,050
7	NR	NR	NR	7	NR	NR	NR

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor; NR= Não realizado

APÊNDICE 12 – Quantificação de CXCR3 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo	Tempo pós-infecção			Grupo	Tempo pós-infecção		
	AR	12h	48h		120h	BR	12h
1	1,955	0,205	0,000	1	0,060	0,000	0,020
2	0,000	0,075	0,085	2	0,200	0,200	0,210
3	0,000	0,000	0,000	3	0,000	0,000	0,000
4	0,000	0,000	0,955	4	0,295	0,310	0,860
5	0,090	0,110	0,160	5	0,000	0,020	0,070
6	0,420	0,550	0,310	6	0,000	0,000	0,085
7	0,400	0,440	0,390	7	0,190	0,480	NR

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor; NR= Não realizado

APÊNDICE 13 – Quantificação de CCR5 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo		Tempo pós-infecção			Grupo		Tempo pós-infecção		
AR	12h	48h	120h	BR	12h	48h	120h		
1	0,00	0,000	1,733	1	0,053	0,000	0,123		
2	0,00	0,000	0,000	2	0,000	0,000	0,000		
3	0,00	0,386	0,000	3	0,000	0,000	0,000		
4	0,00	1,957	0,000	4	0,000	0,000	0,000		
5	0,00	0,000	0,060	5	0,590	0,000	0,000		
6	0,43	0,100	0,150	6	0,000	0,000	0,000		
7	NR	NR	NR	7	0,060	0,080	NR		

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor; NR= Não realizado

APÊNDICE 14 – Quantificação de CCR4 no RNAm de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo		Tempo pós-infecção			Grupo		Tempo pós-infecção		
AR	12h	48h	120h	BR	12h	48h	120h		
1	1,305	0,685	0,000	1	0,545	0,000	0,170		
2	0,345	0,615	0,765	2	1,390	0,320	3,250		
3	0,405	0,335	0,000	3	0,205	0,000	0,075		
4	0,000	0,000	0,295	4	0,040	0,130	0,180		
5	0,260	0,110	NR	5	0,000	0,000	0,020		
6	0,140	0,000	0,020	6	0,140	0,045	0,000		
7	0,000	0,000	0,000	7	0,260	0,105	NR		

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor; NR= Não realizado

APÊNDICE 15 – Quantificação de IL-12 nos sobrenadantes de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo	Tempo pós-infecção			Grupo	Tempo pós-infecção		
	AR	12h	48h		120h	BR	12h
1	39,900	5,300	24,900	1	5,330	0,510	7,700
2	NR	0,000	12,600	2	0,000	7,800	NR
3	0,000	0,000	0,000	3	10,200	0,500	0,000
4	5,300	37,400	15,100	4	0,000	NR	NR
5	128,300	126,700	NR	5	2,900	10,200	22,500
6	22,100	17,000	NR	6	0,500	12,600	5,300
7	4,000	8,000	NR	7	140,000	37,800	NR

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor; NR= Não realizado

APÊNDICE 16 – Quantificação de IL-13 nos sobrenadantes de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo	Tempo pós-infecção			Grupo	Tempo pós-infecção		
	AR	12h	48h		120h	BR	12h
1	1357	1137	1364	1	1131	1404	1412
2	1404	1498	2150	2	1525	1148	3254
3	1349	1498	2216	3	1341	1507	1633
4	1334	2057	2713	4	1334	1364	2494
5	1000	7000	NR	5	2339	3630	4922
6	1000	1000	NR	6	7046	9921	11169
7	0	8000	NR	7	10000	23000	NR

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor; NR= Não realizado

APÊNDICE 17 – Quantificação de IL-10 nos sobrenadantes de culturas de CMSP, de indivíduos sadios AR e BR, estimulados com promastigotas vivas de *L. amazonensis*, com 12, 48 e 120 horas de infecção.

Grupo		Tempo pós-infecção			Grupo		Tempo pós-infecção		
AR		12h	48h	120h	BR		12h	48h	120h
1		2527,4	57,8	610,1	1		885,0	1542,2	784,0
2		18,5	504,6	1197,1	2		1700,0	1022,3	551,8
3		650,1	406,5	460,1	3		1011,0	806,6	835,0
4		579,2	1293,0	824,1	4		1413,3	1366,1	996,1
5		426,0	443,0	NR	5		507,7	1075,7	1253,2
6		581,0	403,0	NR	6		523,5	1526,8	1396,5
7		139,0	18,0	NR	7		995,0	792,0	NR

AR= Alto respondedor; BR= Baixo respondedor; NR= Não realizado